

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE
CIPROFLOXACINO A PARTIR DE BIOMATERIALES
MESOESTRUCTURADOS SINTETIZADOS VÍA SOL-GEL**

POR

QFB. CYNTHIA GUADALUPE GONZÁLEZ CARVAJAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

DICIEMBRE, 2017

“ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE
CIPROFLOXACINO A PARTIR DE BIOMATERIALES
MESOESTRUCTURADOS SINTETIZADOS
VÍA SOL-GEL”

Aprobación de tesis

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

PRESIDENTE

SECRETARIA

VOCAL

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE
CIPROFLOXACINO A PARTIR DE BIOMATERIALES
MESOESTRUCTURADOS SINTETIZADOS
VÍA SOL-GEL”

Revisión de la Tesis:

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Directora de tesis

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Co-directora de tesis

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño
Comité tutorial

Dra. Patricia González Barranco
Comité tutorial

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán
Comité tutorial

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

Cynthia Guadalupe González Carvajal Fecha de Graduación: Diciembre 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE CIPROFLOXACINO A PARTIR DE BIOMATERIALES MESOESTRUCTURADOS SINTETIZADOS VÍA SOL-GEL.

Número de páginas: 89

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: La utilización de sistemas de liberación sostenida permite una alta concentración del fármaco en el sitio de acción, mejorando la relación eficacia/seguridad terapéutica, además, ofrecen una disminución en el riesgo de desarrollo de reacciones adversas sistémicas. El propósito de este trabajo radica en la síntesis de biomateriales cerámicos mesoporosos ordenados de sílice que contengan ciprofloxacino y presenten una cinética de liberación sostenida, para obtener el potencial de ser desarrollados como implantes que puedan ser utilizados en el tratamiento y profilaxis de infecciones osteoarticulares.

Contribuciones y Conclusiones: La síntesis del biomaterial se realizó a diferentes relaciones de precursores, Tetraetilortosilicato (TEOS)/Agua. Los resultados de las pruebas de liberación indican que los biomateriales mesoestructurados sintetizados en mayores proporciones de agua (TEOS/Agua 1:8) presentaron un porcentaje de incorporación de 15.44% y la liberación fue de 57% en un tiempo mayor de 72 h. Este comportamiento concuerda con las características texturales, ya que presentan gran área superficial y diámetro de poro. La técnica sol-gel permitió desarrollar materiales a base de SiO_2 en forma de polvos y películas capaces de incorporar ciprofloxacino durante la síntesis y por impregnación, para una liberación sostenida.

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas (Asesora)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León por la aceptación de entrar en su programa de posgrado; así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de mi maestría.

Agradezco a la Dra. Lucía Cantú Cárdenas por confiar en mí para el desarrollo de este proyecto, por el apoyo para realizarlo y por sus enseñanzas y consejos en mi camino por la UANL.

A mi co-asesora Dra. Aracely Hernández y a mi comité tutorial, la Dra. Patricia Esquivel, Dra. Elizabeth Orozco, Dra. Patricia González, que fortalecieron mi aprendizaje y con sus observaciones y preguntas han enriquecido este proyecto.

Al Laboratorio de Biofarmacia por abrirme las puertas para realizar el proyecto y a mis compañeros de posgrado por su convivencia y apoyo.

Al Dr. Javier E. Morales Valenzuela y su grupo, por los conocimientos brindados y por recibirme en mi estancia académica en el Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Al Dr. Leonardo Ferriño y a la Dra. Leticia Torres, por el apoyo otorgado para la realización de los estudios de caracterización en el Departamento de Ecomateriales y Energía, de la Facultad de Ingeniería Civil, UANL.

Agradezco a mi familia por su apoyo y por estar a mi lado incondicionalmente; a mis amigos y a todos aquellos a quienes no he nombrado, pero estuvieron presentes cuando los necesité.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
NOMENCLATURA	x
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biomateriales	1
1.1.1 Materiales cerámicos.....	1
1.1.1.1 Materiales mesoestructurados	3
1.1.1.2 Funcionalización de nanopartículas mesoporosas.....	3
1.2 Proceso de la síntesis Sol-gel.....	4
1.3 Fármaco incorporado: Ciprofloxacino	5
1.3.1 Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas	5
1.3.2 Mecanismo de acción.....	6
1.3.3 Uso terapéutico y actividad antibacteriana	6
1.3.4. Formas comerciales	7
1.4 Validación de métodos analíticos	8
ANTECEDENTES	10
2.1 Justificación	16
2.2 Aportación científica	18
2.3 Hipótesis.....	18
2.4. Objetivo general.....	18
2.4.1 Objetivos específicos.....	18
2.5 Metas.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Materiales	20
3.1.1 Reactivos y equipos	20
3.2 Metodología general	21
3.2.1 Síntesis del biomaterial	21
3.2.1.1 Síntesis del biomaterial en polvo.....	22
3.2.1.2 Síntesis del biomaterial en películas	24

3.2.2 Forma de incorporar el fármaco	25
3.2.2.1 Incorporación del fármaco durante la síntesis	25
3.2.2.2 Incorporación del fármaco por impregnación	26
3.2.3 Caracterización de los biomateriales	26
3.2.3.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). ..	26
3.2.3.2 Análisis térmico diferencial y termogravimétrico (ATG-ATD).	26
3.2.3.3 Difracción de rayos X (DRX).	26
3.2.3.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)	26
3.2.3.5 Análisis textural: BET-BHJ.	27
3.2.4 Identificación y cuantificación de ciprofloxacino	27
3.2.4.1 Cuantificación de ciprofloxacino por espectrofotometría UV-Vis. 27	
3.2.4.1.1 Curva de calibración por espectrometría UV-Vis	28
3.2.4.2 Cuantificación de ciprofloxacino por HPLC-UV	28
3.2.5 Pruebas de extracción.....	29
3.2.6 Evaluación de la liberación de ciprofloxacino	30
3.2.6.1 Evaluación de la cinética liberación in vitro mediante la adaptación del método de perfil de disolución.....	30
3.2.6.2 Evaluación de la liberación mediante la determinación del efecto bactericida.....	30
3.2.7 Método alternativo de síntesis de nanopartículas de sílice y modificación de sus propiedades por funcionalización.....	33
3.2.7.1 Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa por el método de Arriagada y col.	33
3.2.7.2 Funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa	33
3.2.8 Pruebas de adsorción de ciprofloxacino en nanopartículas de sílice mesoporosa sintetizada por el método de Arriagada y col.	34
3.2.8.1 Incorporación de ciprofloxacino en nanopartículas	34
3.2.8.2 Cuantificación de ciprofloxacino para nanopartículas	34
3.2.9 Caracterización de nanopartículas de sílice sintetizadas por el método de Arriagada y col.	36
3.2.9.1 Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta	36

3.2.9.2. Determinación del mecanismo de adsorción de ciprofloxacino en las nanopartículas mediante modelos isotérmicos	36
RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
4.1 Biomateriales sintetizados	37
4.1.1 Biomateriales sintetizados en forma de polvo	37
4.1.2 Biomateriales sintetizados en forma de película.....	39
4.2 Caracterización de los materiales	40
4.2.1 Análisis térmico de ciprofloxacino y de los materiales sin calcinar	40
4.2.1.1 Ciprofloxacino	41
4.2.1.2 Materiales en fresco	41
4.2.1.3 Materiales que contienen ciprofloxacino incorporado durante la síntesis	43
4.2.1.4 Materiales impregnados con ciprofloxacino	44
4.2.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	44
4.2.2.1 Ciprofloxacino	45
4.2.2.2 Espectros infrarrojo de los materiales sintetizados en forma de polvos y películas.....	45
4.2.2.3 Espectros infrarrojo de los materiales que incorporan ciprofloxacino durante la síntesis	47
4.2.2.4 Espectros infrarrojo de los materiales impregnados con ciprofloxacino	48
4.2.3 Difracción de rayos X	50
4.2.3.1 Patrón de difracción de ciprofloxacino.....	50
4.2.3.2 Patrones de difracción de los materiales sintetizados.....	51
4.2.3.3 Patrones de difracción de los materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis	52
4.2.3.4 Patrones de difracción de los materiales impregnados con ciprofloxacino	53
4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS)	55
4.2.4.1 Materiales sintetizados en forma de polvos y películas	55
4.2.4.2 Materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis	57

4.2.4.3 Materiales impregnados con ciprofloxacino	58
4.2.5 Análisis textural: BET-BHJ	60
4.2.5.1 Materiales sintetizados en forma de polvos y películas	60
4.2.5.2 Materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis	63
4.2.5.3 Materiales impregnados con ciprofloxacino	65
4.3 Identificación y cuantificación de ciprofloxacino.....	67
4.3.1 Cuantificación de ciprofloxacino por espectrofotometría UV-Vis	67
4.3.1.1 Curva de calibración por espectrometría UV-Vis	67
4.3.2 Cuantificación de ciprofloxacino por HPLC-UV	68
4.3.2.1 Validación del método analítico.....	69
4.3.3 Pruebas de extracción.....	71
4.3.4 Evaluación de la liberación de ciprofloxacino	72
4.3.4.1 Evaluación de la cinética liberación in vitro mediante adaptación del método de perfil de disolución.....	72
4.3.4.2 Evaluación de la liberación mediante la determinación del efecto bactericida.....	75
4.4 Método alternativo de síntesis de nanopartículas de sílice y modificación de sus propiedades por funcionalización.....	77
4.4.1 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa por el método de Arriagada y col.....	77
4.5 Pruebas de adsorción de ciprofloxacino en nanopartículas de sílice mesoporosa sintetizada por el método de Arriagada y col.	77
4.5.1 Incorporación de ciprofloxacino en nanopartículas	77
4.5.2 Cuantificación de ciprofloxacino para las nanopartículas	78
4.6 Caracterización de nanopartículas de sílice sintetizadas por el método de Arriagada y col.....	79
4.6.1 Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta.....	79
4.6.2 Determinación del mecanismo de adsorción de ciprofloxacino en las nanopartículas mediante modelos isotérmicos.....	81
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general para la síntesis de materiales de sílice mesoporosa o mesoestructurada en polvo.....	23
Figura 2 . Estructura del tensoactivo Pluronic P-123 ($x=20$, $y=70$, $z=20$)	24
Figura 3. Esquema general para la síntesis de películas de sílice mesoporosa o mesoestructurada	25
Figura 4. HPLC Waters Alliance 2695 System con detección UV.....	28
Figura 5. Esquema de la ubicación de los discos en las caja de petri	32
Figura 6 . Estructura de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	33
Figura 7 . Estructura de (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES).....	34
Figura 8. HPLC Shimadzu 20A System con detección UV/VIS	35
Figura 9. Análisis térmico ATG-ATD de ciprofloxacino	41
Figura 10. Análisis térmico ATG-ATD de polvos en fresco de SiO_2 relación molar 1:6.....	42
Figura 11. Análisis térmico ATG-ATD de polvos en fresco de SiO_2 con pluronic relación molar 1:6	42
Figura 12 . Análisis térmico ATG-ATD de materiales en polvo conteniendo ciprofloxacino incorporado durante la síntesis: a) 1:6:Cipro, b) 1:8:Cipro	43
Figura 13 . Análisis térmico ATG-ATD de materiales en polvo impregnados con ciprofloxacino: a) 1:6:CiproIM, b) 1:6:PLU:CiproIM, c) 1:8:CiproIM, d) 1:8:PLU:CiproIM	44
Figura 14. Espectro infrarrojo de ciprofloxacino	45
Figura 15. Espectro infrarrojo de polvos de SiO_2 de relación molar: a) 1:6, b) 1:8	46
Figura 16. Espectro infrarrojo de películas de SiO_2 de relación molar: a) 1:6 b) 1:8	47
Figura 17. Espectro infrarrojo de materiales que incorporan ciprofloxacino durante la síntesis.....	48
Figura 18. Espectro infrarrojo de materiales en polvo impregnados con ciprofloxacino	49

Figura 19. Espectro infrarrojo de materiales en película impregnados con ciprofloxacino	50
Figura 20. Patrón de difracción de rayos X de ciprofloxacino	51
Figura 21. Patrones de difracción de rayos X de polvos de SiO ₂ relación molar: a) 1:6 y b)1:8.....	52
Figura 22. Patrones de difracción de rayos X de los materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis	53
Figura 23. Patrones de difracción de rayos X de los materiales impregnados con ciprofloxacino	54
Figura 24. Comparación de patrones de difracción de rayos X de los materiales en forma de película con y sin impregnar ciprofloxacino	55
Figura 25. Imágenes MEB de polvos de SiO ₂ con relación molar 1:6. a) sin pluronic b) con pluronic c) Análisis elemental por EDS.....	56
Figura 26. Imágenes MEB y espectro EDS de películas de SiO ₂ : a) 1:6, b)1:6:PLU, c)1:8, d) 1:8:PLU	57
Figura 27. Imágenes MEB y espectro EDS de materiales en polvo con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis: a) 1:6:Cipro, b)1:8:Cipro	58
Figura 28. Imágenes MEB y espectro EDS de materiales impregnados con ciprofloxacino: a)1:6:CiproIM, b)1:6:PLU:CiproIM, c)1:8:CiproIM, d)1:8:PLU:CiproIM	59
Figura 29 . Isotermas de adsorción de N ₂ (izquierda) y gráficas de distribución de tamaño de poro (derecha) de materiales en polvo a)1:6, b)1:8, c)1:6:PLU, d)1:8:PLU.....	61
Figura 30. Isotermas de adsorción de N ₂ de materiales sintetizados en forma de películas: 1:8 y 1:8:PLU	62
Figura 31. Distribución de tamaño de poro de materiales sintetizados en forma de películas: a)1:8, b)1:8:PLU.....	63
Figura 32 . Isotermas de adsorción de N ₂ de materiales en polvo con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis	64
Figura 33 . Isotermas de adsorción de N ₂ (izquierda) y gráficas de distribución de tamaño de poro (derecha) de materiales en polvo impregnados con ciprofloxacino: a)1:6:CiproIM, b)1:6:PLU:CiproIM, c)1:8:PLU:CiproIM.....	66
Figura 34. Barrido UV-Vis de ciprofloxacino	67
Figura 35. Curva de calibración para ciprofloxacino por espectrometría UV, obtenida por la preparación de seis estándares	68
Figura 36. Cromatograma de ciprofloxacino (estándar 10 ppm)	69

Figura 37. Curva de calibración de ciprofloxacino en HPLC/UV	71
Figura 38. Cinética de liberación de ciprofloxacino.	73
Figura 39 . Comparación de las cinéticas de liberación de ciprofloxacino. Materiales relación molar: a)polvos 1:6, b)polvos 1:8, c)películas 1:6, d)películas 1:8.....	75
Figura 40. Inhibición de crecimiento bacteriano por el ciprofloxacino a los tiempos: a)48 h, b)72 h	76
Figura 41. Cinética de la liberación de ciprofloxacino mediante el método de difusión en disco	76
Figura 42 . Curva de calibración para ciprofloxacino por HPLC/UV, obtenida por la preparación de seis estándares	79
Figura 43. Adsorción de ciprofloxacino en nanopartículas de sílice. a) Cantidad adsorbida de ciprofloxacino. Ajuste de los datos utilizando las isotermas: b) Langmuir, c) Freundlich y d) Temkin.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades químicas y físicas de ciprofloxacino	6
Tabla 2. Formas de comercialización de ciprofloxacino en México	8
Tabla 3. Lista de equipos para caracterización y ubicación	21
Tabla 4. Condiciones de síntesis de los biomateriales	22
Tabla 5. Tiempos de muestreo para la cinética de liberación	30
Tabla 6 . Placas sembradas para cada material	32
Tabla 7. Condiciones de síntesis probadas y tiempos de gelación	38
Tabla 8. Condiciones finales de síntesis y tiempos de gelación	39
Tabla 9. Síntesis de películas	40
Tabla 10 . Espesor de las películas de relación molar 1:6	40
Tabla 11 . Características texturales obtenidas a partir de las isothermas de adsorción-desorción de materiales en polvo.....	61
Tabla 12. Características texturales obtenidas a partir de las isothermas de adsorción-desorción de materiales en película	62
Tabla 13. Características texturales de materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis.....	64
Tabla 14. Características texturales obtenidas a partir de las isothermas de adsorción-desorción de materiales impregnados con ciprofloxacino	66
Tabla 15. Barrido UV-Vis de ciprofloxacino.....	67
Tabla 16. Estándares de la curva de calibración de ciprofloxacino.....	68
Tabla 17. Datos obtenidos por triplicado (Validación del método por HPLC/UV)	70
Tabla 18. Parámetros generales de validación del método para ciprofloxacino por HPLC/UV	70
Tabla 19 . Resultados de extracción de los biomateriales sintetizados vía sol-gel	72
Tabla 20 . Cantidad de nanopartículas obtenida durante la síntesis.....	77
Tabla 21 . Incorporación de ciprofloxacino en la nanopartícula	78
Tabla 22. Estándares de la curva de calibración de ciprofloxacino.....	79
Tabla 23. Tamaño promedio de nanopartícula	80
Tabla 24. Valores de potencial Zeta de las nanopartículas dispersas en soluciones acuosas a diferentes pH.	81

NOMENCLATURA

ACN Acetonitrilo

ADN Acido desoxirribonucleico

ATD Análisis térmico diferencial

ATG Análisis termogravimétrico

APTES (3-aminopropil)triethoxisilano

BET Brunauer-Emmet-Teller

BJH Barrett-Joyner-Halenda

CIPRO Ciprofloxacino

CTAB Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DRX Difracción de rayos X

ENDO Endotérmico

EDS Espectroscopia de dispersión de energía de rayos X

EXO Exotérmico

FEUM Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

FTIR Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

LC Límite de cuantificación

LD Límite de detección

MIC Concentración mínima inhibitoria

MEB Microscopía electrónica de barrido

MEB-EDS Microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X.

P/Po Presión relativa

ppm Partes por millón

TEOS Tetraetilortosilicato

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Biomateriales

Los biomateriales son sustancias farmacológicamente inertes diseñadas para ser implantadas o incorporadas dentro de un sistema vivo. Para poder ser considerados como tales, es necesario que cumplan con varias condiciones de biocompatibilidad y biofuncionalidad, por el hecho de que estarán en contacto con el cuerpo humano. La biocompatibilidad es la habilidad de un material para ser aceptado por el cuerpo del paciente sin causar toxicidad.¹

Dentro de las características de biofuncionalidad de estos compuestos está la estabilidad química, además, no deben presentar degradación en el tiempo, ni desintegrarse con la saliva, requieren permanecer estables dentro de un intervalo de temperaturas entre 0°C y 100°C, y deben presentar una resistencia mecánica adecuada, entre otras. Los biomateriales idealmente deben ser relativamente económicos, reproducibles y fáciles de fabricar y procesar para su producción en gran escala. Los biomateriales más utilizados se dividen en tres clases: metales, polímeros y cerámicos.^{1,2}

1.1.1 Materiales cerámicos

Los materiales cerámicos son compuestos sólidos inorgánicos con combinaciones de enlaces iónicos o covalentes, están compuestos por elementos metálicos y no metálicos, sus enlaces interatómicos producen un arreglo tridimensional con estructuras cristalinas definidas. La característica principal de las cerámicas es que resisten muy bien las altas temperaturas donde siguen siendo sólidas e incluso, en algunos casos, su dureza aumenta. Entre las cerámicas inertes más frecuentemente empleadas se encuentra la alúmina (Al_2O_3), la zirconia (ZrO_2), el nitruro de silicio (Si_3N_4) y el dióxido de silicio (SiO_2). Tienen la característica de presentar alta resistencia a la compresión, una excelente resistencia al desgaste y una inercia química casi total. ^{2,3}

Las cerámicas con aplicaciones médicas constituyen un interesante campo de investigación y desarrollo para la fabricación y/o fijación de implantes y en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Para esta última aplicación, se requiere que los materiales cerámicos presenten una eficiente habilidad para transportar el principio activo a la región de interés y liberarlo dosificadamente. ⁴

Las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNP's, por sus siglas en inglés) han atraído la atención de la comunidad científica debido a sus propiedades fisicoquímicas, lo que las hace idóneas para ser utilizadas en el campo de la biotecnología y la nanomedicina. Están constituidas por una matriz de sílice (Figura 1) y sus principales características son la presencia de poros de un diámetro comprendido entre los 2 y 50 nm, elevada superficie específica, gran resistencia mecánica, alta estabilidad química, buena biocompatibilidad y versatilidad sintética pudiendo ser obtenidas en múltiples tamaños y formas, así como contar con la factibilidad de ser funcionalizadas. ^{2,5}

Las MSNP's representan una buena alternativa como sistemas de liberación de fármacos, ya que hacen posible la incorporación de elevadas cantidades de principios activos en sus mesoporos y bloquean reversiblemente

su salida, permitiendo un transporte selectivo y una liberación eficaz. La estructura de la pared de los poros de estos materiales está constituida por una red desordenada de puentes siloxano y grupos silanol libres, los cuales pueden interactuar con determinadas especies químicas, que hacen que estos materiales se puedan utilizar como matrices para la adsorción y liberación controlada de moléculas orgánicas. Los materiales mesoporosos de sílice presentan la ventaja de conseguir una distribución homogénea del fármaco dentro de la matriz y dan la posibilidad de incorporar una gran variedad de moléculas orgánicas con actividad terapéutica.^{5,6}

1.1.1.1 Materiales mesoestructurados

Los materiales mesoestructurados de sílice que presenten una porosidad ordenada y controlada en el rango de 2-20 nm se pueden obtener mediante la utilización de agentes directores de estructura que actúen como plantilla durante la síntesis. Para conducir el ordenamiento, se utilizan tensoactivos o surfactantes los cuales son moléculas anfifílicas que en medio acuoso inducen la organización supramolecular o autoensamblaje en micelas. Tras la eliminación del tensoactivo se obtienen materiales con excelentes propiedades texturales como son elevada superficie específica, poca variabilidad en la distribución de diámetro de poro y elevado volumen de poro. A medida que la concentración del tensoactivo aumenta, y en función de las condiciones de síntesis, se originan estructuras con distintas geometrías.⁷

1.1.1.2 Funcionalización de nanopartículas mesoporosas

La incorporación de grupos funcionales orgánicos en estructuras inorgánicas ha conducido al descubrimiento de materiales con capacidad de combinar la variedad funcional de la química orgánica con las ventajas de estabilidad térmica y robustez de una matriz inorgánica. El proceso de funcionalización de las MSNP's se puede realizar por estrategias diferentes en

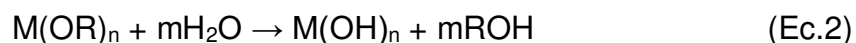
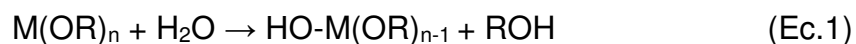
tres dominios: la superficie (injerto), la parte interna de los mesoporos (oclusión) y en la matriz de sílice (co-condensación).^{5,8,9}

En las MSNP's, la presencia de grupos silanol libres en la superficie permite que el proceso ampliamente usado para su funcionalización sea por injerto, ya que es un método post-síntesis que proporciona el anclaje de moléculas, adquiriendo nuevas propiedades como pueden ser, liberación controlada, biodisponibilidad mejorada, entrega dirigida, entre otras.⁹⁻¹²

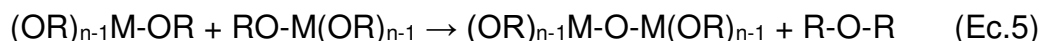
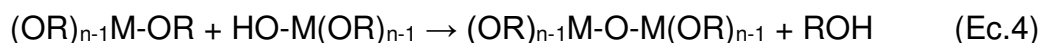
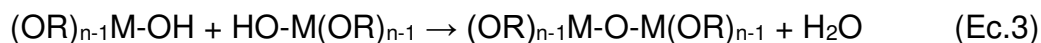
1.2 Proceso de la síntesis Sol-gel

Brinker y Scherer definieron el proceso sol-gel como la obtención de materiales, generalmente óxidos, por medio de la preparación de un sol, su subsecuente gelación y la eliminación del solvente. La síntesis de xerogeles y aerogeles se realiza en dos etapas que ocurren de manera simultánea.¹³

Durante la primera etapa (pre-gelación), ocurre la formación del sol mediante la reacción de hidrólisis del alcóxido metálico, el cual generalmente se disuelve en alcohol o en algún otro solvente apropiado para formar especies sumamente reactivas, en la reacción los grupos hidroxilo (OH) se unen al átomo metálico (M) desplazando total o parcialmente a los grupos alcoxi (OR):¹³



La segunda etapa consiste en una reacción de condensación o polimerización de estas especies mediante los mecanismos en competencia de alcoxolación, oxolación y olación para formar el gel, en esta etapa las condiciones de reacción son muy importantes, ya que determinan la estructura y la textura del producto final. Las reacciones de condensación se efectúan entre moléculas parcialmente hidrolizadas, de acuerdo a:¹³



El proceso sol-gel es un método de preparación accesible, en el cual las reacciones están afectadas por muchos parámetros sintéticos, tales como la naturaleza y concentración de los reactivos, disolventes y catalizadores, así como la temperatura de reacción y velocidad de eliminación de los subproductos y disolventes, además, la presencia de componentes orgánicos, en el caso de materiales funcionalizados, modifica la morfología y las propiedades físicas de los productos obtenidos por sol-gel.^{4,14}

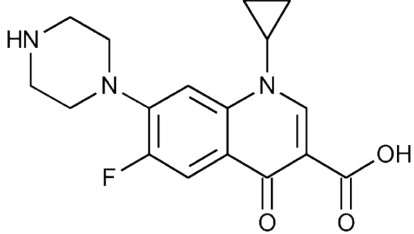
1.3 Fármaco incorporado: Ciprofloxacino

El ciprofloxacino, es un fármaco con actividad antimicrobiana de amplio espectro que pertenece al grupo de las quinolonas, es un análogo fluorado sintético del ácido nalidíxico con actividad contra una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas.¹⁵

1.3.1 Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas

Las propiedades farmacocinéticas de ciprofloxacino indican que después de su administración oral presenta una biodisponibilidad entre el 70 y 95% y que se distribuye ampliamente en los líquidos y tejidos corporales. La dosis en adultos es de 250 a 750 mg cada 12 horas y la vida media sérica varía de 3 a 7 horas. El volumen de distribución es grande, se metaboliza parcialmente en el hígado por modificación del grupo piperazinilo a cuatro diferentes metabolitos activos de menor potencia (desetilenciprofloxacino, sulfociprofloxacino, oxociprofloxacino y formilciprofloxacino). Se elimina por mecanismos renales, ya sea secreción tubular o filtración glomerular.^{15,16}

Tabla 1. Propiedades químicas y físicas de ciprofloxacino

Propiedades Químicas y Físicas			
Estructura		Color	A la luz polvo cristalino débilmente amarillo
		Punto de fusión	255-257 °C
Nombre IUPAC	Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-quinolin-3-carboxílico	Solubilidad	Insoluble en etanol, soluble en HCl, casi insoluble en agua
Fórmula empírica	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	LogP	0.28 (no ionizada)
Peso molecular	331.341523 g/mol	pKa	pKa = 6.09 (ácido carboxílico); pKa = 8.74 (nitrógeno de la piperazina)
λ	278 – 316 nm		

1.3.2 Mecanismo de acción

El ciprofloxacino bloquea la síntesis de ADN bacteriano por inhibición de la topoisomerasa II bacteriana (ADN girasa) y la topoisomerasa IV necesarias para la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN. La inhibición de la enzima ADN girasa evita la formación del nodo de superhélice positiva necesario para la transcripción y la replicación normales. La inhibición de la topoisomerasa IV interfiere con la separación del ADN cromosómico replicado en las células hijas respectivas durante la división celular.¹⁶

1.3.3 Uso terapéutico y actividad antibacteriana

El ciprofloxacino es efectivo en infecciones urinarias agudas como cistitis, pielonefritis y en infecciones complicadas. También es eficaz para tratar la diarrea bacteriana, la uretritis o cervicitis y se administra para el tratamiento de la tuberculosis y de infecciones por micobacterias atípicas. El ciprofloxacino se ha usado en infecciones del aparato respiratorio y de la cavidad intraabdominal, así

como en infecciones de tejidos blandos, huesos y articulaciones, incluidas las producidas por microorganismos multirresistentes, como las especies de *Pseudomonas* y *Enterobacter*.^{15,16}

Se administra ciprofloxacino en infecciones osteoarticulares (osteomielitis aguda y crónica, artritis séptica e infecciones relacionadas con prótesis articulares), aunque estos son procesos poco frecuentes, son importantes, ya que presentan un manejo difícil y numerosas complicaciones. En este tipo de infecciones *Staphylococcus aureus* es el principal agente causal, el cual se presenta en el 80% de las infecciones osteoarticulares. Las enterobacterias también son de interés en este tipo de infecciones, son comunes en osteomielitis postquirúrgicas o postraumáticas, de evolución crónica y adquisición nosocomial. *Pseudomonas aeruginosa* también es un microorganismo frecuente en osteomielitis asociadas a pie diabético y osteomielitis de huesos del pie tras heridas punzantes y en infecciones asociadas a implantes. El espectro de actividad del ciprofloxacino es amplio, es más activo contra *P. aeruginosa*, la concentración mínima inhibitoria 90 (MIC90) varía de 0.5 a 6 µg/mL y también presenta buena actividad contra estafilococos, pero no contra cepas resistentes a meticilina (MIC90 = 0.1 a 2 µg/mL). El ciprofloxacino es ampliamente utilizado como una medida profiláctica de infecciones en cirugías de huesos.¹⁵⁻¹⁷

1.3.4. Formas comerciales

Existen diferentes medicamentos con ciprofloxacino comercializados actualmente en México, estos contienen diferentes sales del principio activo, se presentan en diferentes formas farmacéuticas y se administran a diversas dosis en función de cada una de sus indicaciones terapéuticas (Tabla 2).¹⁸

Tabla 2. Formas de comercialización de ciprofloxacino en México

Principio activo	Clorhidrato de ciprofloxacino monohidratado	Lactato de ciprofloxacino	Clorhidrato de ciprofloxacino
Forma farmacéutica	Tableta	Solución inyectable	Tableta liberación prolongada
Vía de administración	Oral	Intravenosa	Oral
Dosis	250, 500 ó 750 mg	200 ó 400 mg	500 ó 1,000 mg
Periodo de administración	Cada 12 horas	Cada 12 horas	Cada 24 horas
Indicación terapéutica	Infecciones osteoarticulares, neumonías, infecciones de piel y tejidos blandos	Infecciones osteoarticulares, ginecológicas, respiratorias, de oído, de tejidos blandos, vías urinarias, órganos genitales, fiebre tifoidea, shigellosis.	Infecciones agudas no complicadas como cistitis, pielonefritis e infecciones complicadas del tracto urinario.

1.4 Validación de métodos analíticos

Es necesario contar con métodos analíticos validados para la cuantificación de fármacos, ya que el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas conlleva a evaluar su comportamiento de liberación.

La validación de un método es el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con evidencia consistente con las aplicaciones propuestas.^{19,20}

El proceso de validación de los métodos analíticos puede comprender, pero no está limitado, al estudio de los siguientes parámetros analíticos:¹⁹

- a) Estabilidad de la muestra: es la propiedad del analito por analizar, de conservar sus características y permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, desde el momento del muestreo hasta su análisis.
- b) Exactitud: es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la referencia.
- c) Linealidad: es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito (sin sesgo).
- d) Límite de detección (LD): es la mínima concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de aplicación del método.
- e) Límite de cuantificación (LC): es la cantidad mínima de analito que puede cuantificarse, cumpliendo con precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones de aplicación del método.
- f) Precisión: es el grado de concordancia relativa entre resultados analíticos obtenidos al aplicar el método, bajo las mismas condiciones de análisis (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea.
- g) Selectividad: es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

La nanotecnología y la liberación controlada de fármacos han cobrado una gran fuerza a partir del año 2000. El objetivo de esta técnica de liberación de sustancias es reducir la frecuencia de administración, liberar el fármaco en el sitio de interés y evitar que el fármaco cause efectos secundarios severos. Hasta la fecha se han desarrollado una gran cantidad de materiales, tanto orgánicos como inorgánicos, con diversas formas y diferente tamaño de partícula, que son usados dependiendo del órgano o del tejido en el que se liberará el fármaco, incluyendo corazón, hígado, cerebro y hueso.¹³

La síntesis de materiales mesoporosos a base de sílice fue reportada por primera vez a principios de la década de 1990, se basa en el uso de tensoactivos como plantilla mesoestructurada para el montaje y condensación posterior de precursores inorgánicos. La eliminación del tensoactivo deja una red de cavidades en la superficie de la sílice, lo que determina las propiedades fisicoquímicas de los materiales resultantes. A partir de ahí, estos materiales mesoporosos han sido utilizados como sistemas de liberación de fármacos, a través de interacciones entre los grupos silanol, que cubren la superficie del canal mesoporoso, los grupos funcionales del fármaco y el solvente. Los parámetros que rigen los procesos de absorción y liberación de fármacos dependen principalmente de esas interacciones.²¹

En el año 2006, Catauro M. y colaboradores, sintetizaron y evaluaron un sistema de liberación sostenida para el tratamiento local de enfermedades periodontales. La síntesis se realizó por el método sol-gel, utilizando ampicilina sódica como fármaco incorporado a dos materiales amorfos TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{4SiO}_2$ usando butóxido de titanio(IV) y tetrametilortosilicato (TMOS) como precursores, se realizó una comparación en la liberación y bioactividad *in vitro* de ambas. Encontrando que en el gel de TiO_2 , la ampicilina fue liberada de una manera relativamente rápida en las primeras horas y después de una manera controlada durante 100 h, mientras a partir de $\text{TiO}_2\text{4SiO}_2$ la liberación fue más lenta y se llevó a cabo aproximadamente en una semana (200 h). La bioactividad de los materiales se demostró por la formación de una capa de hidroxiapatita en la superficie de los materiales a los 14 días de estar en contacto con un fluido corporal simulado.²²

Czarnobaj K. y colaboradores, en 2007, incorporaron cisplatino (fármaco antineoplásico) vía sol-gel en tres matrices a base de sílice: SiO_2 , SiO_2 -PDMS (polidimetilsiloxano), SiO_2 -PEG (polietilenglicol). Evaluaron el efecto de las condiciones de secado y de la funcionalización de la sílice en la liberación del fármaco. El tratamiento térmico de todos los xerogeles con cisplatino a la temperatura de 80°C resultó en la aceleración de la liberación del fármaco y en el aumento de la cantidad liberada (89-98%). La funcionalización con polímeros orgánicos resultó en el incremento del tamaño del poro comparado con el que se presenta en la sílica pura.²³ En este mismo año Hernández A. y colaboradores por el método sol-gel incorporaron piroxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo) en un material cerámico de sílice, variando diferentes parámetros de la síntesis, tales como el pH (3 y 5) y la relación alcóxido/agua (1:6 y 1:8), concluyendo que las características del material que condujeron a la mejor incorporación del fármaco fueron a pH 5 y relación molar 1:6.²⁴

En 2009, López T. y colaboradores, realizaron un estudio cinético de la liberación de dos fármacos antiepilépticos (ácido valproico y fenitoína)

incorporados en una matriz de TiO_2 vía sol-gel. Los estudios *in vitro* mostraron que la liberación de los fármacos en la mayoría de los biomateriales seguía una cinética de primer orden, con excepción de uno que presentó una cinética de orden cero. Los estudios *in vivo* de fenitoína no presentaron eficacia satisfactoria mientras que los llevados a cabo con ácido valproico mostraron que una muestra cristalina y con menor concentración de fármaco fue más efectiva en la prevención de eventos epilépticos que los biomateriales amorfos con un mayor contenido de principio activo, demostrando que el polimorfismo juega un papel importante en la velocidad de liberación del ácido valproico.²⁵

Otro grupo de estudio, en 2014, bajo la dirección de González M. y con la colaboración de López T., propusieron un método más eficaz para la síntesis de materiales nanoestructurados de TiO_2 conteniendo los mismos fármacos, ácido valproico (AV) y fenitoína (fent), optimizando la incorporación de diferentes cantidades del fármaco con una relación alcóxido/solvente/agua, 1:4:16 para fenitoína y 1:8:8 para ácido valproico. La optimización de la incorporación de ambos fármacos en la matriz nanoestructurada obtuvo mejores resultados para las muestras de $\text{TiO}_2(\text{OH})\text{-Fent-(100mg)}$ y de $\text{TiO}_2(\text{OH})\text{-AV-(200mg)}$.²⁶

En 2010, Sundblom A. y colaboradores, estudiaron la formación de sílice mesoestructurada mediante la adición del tensoactivo pluronic 123. Realizaron la síntesis de tres materiales variando el tiempo de la reacción de hidrólisis, S1-1 (2 h 15 min), S1-2 (23 h) y S1-3 (5 días), a pH de 3.3 a partir de TEOS con una solución acuosa de pluronic 123 en relación 1:1.5:100 ($\text{SiO}_2\text{:P123:H}_2\text{O}$). La mejor formación de sílice mesoestructurada tras la remoción del tensoactivo fue en el material S1-2, por lo que se concluye que el tiempo de hidrólisis y el grado de condensación es importante para la formación de sílice mesoestructurada.²⁷

En 2014, Bhattacharyya S. y colaboradores, elaboraron películas delgadas para la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y evaluaron su actividad *in vitro*. Estas películas de sílice se obtuvieron vía sol-gel

para la liberación controlada del antibiótico vancomicina y farnesol un compuesto orgánico natural. Los resultados del estudio demostraron que la incorporación de farnesol no afecta la formación de las películas, ni la liberación de vancomicina, al contrario, demuestran un aumento en la potencia de la vancomicina para la inhibición de MRSA. La incorporación de vancomicina y farnesol durante la síntesis vía sol-gel para la obtención de películas delgadas representa una nueva formulación para el tratamiento con antibióticos.²⁸

Hu L y colaboradores, en 2014, crearon un sistema de liberación sostenida de un fármaco poco soluble en agua, la indometacina, mediante la incorporación de ésta en una sílice mesoporosa funcionalizada con un polímero orgánico natural (alginato). Los resultados mostraron que la liberación sostenida de indometacina se desaceleró de manera efectiva debido principalmente a los efectos bloqueantes del recubrimiento con alginato. Esta combinación ayuda a diseños de liberación sostenida oral para fármacos poco solubles en agua.²⁹

En 2014, Catauro M. y colaboradores, estudiaron la cinética de liberación y la bioactividad de materiales híbridos de SiO_2 con PCL (poli caprolactona) sintetizados vía sol-gel, incorporando un fármaco antiinflamatorio, el ketoprofeno. Realizaron diversas síntesis a partir del tetraetilortosilicato modificando la cantidad de PCL (6, 12, 50%) y de fármaco incorporado (5, 10, 15%). Demostraron la bioactividad de los materiales híbridos sintetizados por la formación de una capa de hidroxiapatita. La mayor liberación de ketoprofeno se produjo durante las primeras horas, subsecuentemente la velocidad disminuyó proporcionando una dosis de mantenimiento hasta el final del experimento (7 h).⁴

Kawashita M. y colaboradores, en el año 2015, realizaron un estudio donde evaluaron la formación *in vitro* de apatita y la liberación de un colorante como modelo de un fármaco hidrofílico (rodamina B), a partir de microesferas porosas de TiO_2 preparadas vía sol-gel con diferente contenido de SiO_2 . Como resultado se dio la formación de apatita en la superficie de las microesferas a los

ocho días de estar en contacto con un fluido corporal simulado. La liberación de rodamina B fue rápida en las primeras horas y después ocurrió una difusión prolongada. Concluyeron que las microesferas porosas de TiO_2 tienen un alto potencial como rellenos de cemento de liberación de fármacos para tratamiento quimioterapéutico de tumores metastásicos de hueso.³⁰

Mohseni M. y colaboradores, en 2015, realizaron la síntesis y caracterización de nanopartículas de sílice mesoporosa conteniendo rifampicina (antibiótico contra *Mycobacterium tuberculosis*) como un potencial sistema de liberación de fármacos de acción pulmonar. La síntesis se realizó a partir del TEOS y de un tensoactivo, bromuro de cetilmetilamonio (CTAB). Los resultados mostraron un tamaño de partícula de 218 ± 46 nm y un área superficial de $816 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Las nanopartículas de sílice mesoporosa conteniendo rifampicina fueron capaces de liberar 95% del contenido de fármaco después de 24 h, siguiendo una liberación más rápida en las primeras cuatro horas.³¹

En 2015, De Oliveira L. y colaboradores, utilizaron materiales mesoporosos con diferente tamaño y distribución de poro, los cuales fueron funcionalizados con ácido fólico y se les incorporó metotrexato (agente antineoplásico). Los resultados de la liberación *in vitro* mostraron que la liberación es más prolongada en los materiales mesoporosos funcionalizados que en los que no contenían ácido fólico, en éstos la constante de liberación fue de $K=0.39$, comparada con la obtenida de los materiales sin funcionalizar, $K=4.12$, lo cual se atribuye a las interacciones que se presentan con los grupos generados durante la funcionalización.⁹

Se ha reportado la incorporación de ciprofloxacino en diferentes matrices, con el fin de generar sistemas de liberación sostenida, para lo cual se han estudiado variaciones en el tipo y cantidad de reactivos, en el proceso y en las condiciones de síntesis.

En 2013, Sasikumar S., realizó un estudio *in vitro* del efecto del tamaño de partícula en la cinética de liberación del clorhidrato de ciprofloxacino en una matriz biocerámica de fosfato de calcio. Los resultados mostraron que la liberación de ciprofloxacino fue inicialmente muy rápida y después presentó una velocidad más lenta, que se mantuvo durante varios días. Demostraron también que para este fármaco, el tamaño de partícula juega un papel importante en la cinética, ya que la liberación es más rápida en partículas más grandes mientras que la liberación es más sostenida cuando el tamaño de partícula es menor.³²

Mabrouk M. y colaboradores, en 2014, realizaron un estudio para evaluar el efecto de la incorporación de ciprofloxacino en un polímero a base de alcohol polivinílico (PVA) y en una matriz híbrida sintetizada a partir de tetraetilortosilicato y PVA. Los resultados mostraron perfiles de liberación sostenida del ciprofloxacino, la cinética de liberación a partir de la matriz híbrida obtuvo mayor porcentaje de ciprofloxacino liberado comparado con el que presenta el polímero orgánico solo, esto lo atribuyen a que en la matriz híbrida no hay espacio libre para el ciprofloxacino, lo que provoca una liberación rápida del fármaco.¹⁷

En 2015, Cicco S. y colaboradores, realizaron la incorporación de ciprofloxacino en materiales de biosílica a partir del nitróxido cíclico 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido (TEMPO) producido por *Thalassiosira weissflogii* y los funcionalizaron con (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES). El TEMPO-funcionalizado da como resultado un cambio en las propiedades del biomaterial, tanto en la capacidad de incorporación del fármaco como en la cinética de liberación, presentando un comportamiento de liberación inicial rápida seguido de un proceso lento. Además, demostraron que el biomaterial funcionalizado aporta estabilidad al ciprofloxacino, ya que reduce la producción de radicales libres del ciprofloxacino debido a que el TEMPO presenta actividad antioxidante relacionada con su capacidad de eliminar los radicales superóxido, peróxido y alquil.^{33,34}

A partir del proceso sol-gel se han sintetizado una amplia variedad de biomateriales cerámicos útiles para sistemas de liberación modificada de fármacos. Se han incorporado a estos materiales cerámicos diversos principios activos, dentro de los que destacan antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, antiepilépticos, antineoplásicos y antibióticos, entre otros. Además, se ha variado el tipo de precursor que se utiliza para la síntesis, así como la relación de éste con los solventes, también el valor del pH durante la síntesis de los materiales ocasiona comportamientos diferentes de la polimerización del precursor. Adicionalmente, la utilización de tensoactivos con características químicas diferentes produce ordenamiento en la formación de poros, así mismo estos poros pueden ser modificados al utilizar polímeros para funcionalizar la matriz y así favorecer la unión del fármaco, ocasionando una liberación del principio activo más prolongada.

La utilización de una matriz cerámica de óxido de silicio para la liberación del antibiótico ciprofloxacino es una nueva alternativa para sistemas de liberación prolongada, cuyo comportamiento dependerá de sus propiedades texturales, mismas que se estudiaron modificando la relación alcóxido/agua, la utilización de dos formas de incorporación del fármaco, la síntesis de los materiales en forma de polvos y películas.

Se estudió además una variante de los métodos de liberación, la difusión en agar, que permite estudiar condiciones *in vitro* utilizando un cultivo bacteriano, que simule de forma más cercana las condiciones de exposición de un implante. Todo lo anterior provee potenciales aplicaciones en el campo de la nanotecnología, la farmacia y la medicina.

2.1 Justificación

El ciprofloxacino es un antibiótico fluoroquinolónico de segunda generación que fue sintetizado en 1981 y ha sido señalado como el agente

antibacteriano que más se consume a nivel mundial y el número cinco más comúnmente prescrito en los Estados Unidos de América. El alto nivel de utilización del ciprofloxacino ha desarrollado una importante resistencia bacteriana, debida al mal uso en una administración innecesaria o al consumo en dosis irregulares. Durante el tratamiento con fluoroquinolonas, surge aproximadamente una bacteria resistente de cada 10^7 - 10^9 microorganismos. La resistencia bacteriana se debe a una o más mutaciones puntuales en la región de unión de la fluoroquinolona en la enzima o a un cambio en la permeabilidad del microorganismo. La resistencia a una fluoroquinolona generalmente confiere resistencia cruzada contra todos los demás miembros de esa clase.

Aunado a esto, se han reportado estudios clínicos relacionados con los efectos adversos, algunos asociados a la generación de radicales libres por parte del antibiótico, de tal manera que el empleo de formas farmacéuticas que permitan un efecto localizado en el sitio de la infección representa una reducción de la absorción sistémica y por ende una disminución de los efectos adversos, así mismo el mantenimiento de concentraciones terapéuticas constantes durante el tiempo de duración de la terapia, reduce el riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana.

Por estas razones, en el presente trabajo se sintetizaron biomateriales cerámicos mesoporosos ordenados de sílice que contienen ciprofloxacino y se estudió la cinética de liberación al modificar las condiciones de síntesis para proporcionar una liberación sostenida. Los biomateriales se elaboraron como polvos y también en forma de películas, los cuales tendrán potencial para desarrollar implantes que puedan ser utilizados en la profilaxis o tratamiento de infecciones osteoarticulares. Estas formas de dosificación presentan como ventaja, sobre las de acción sistémica, que proporcionan una alta concentración de agente antimicrobiano en el sitio de la infección y mejora la relación eficacia/seguridad terapéutica. Ofreciendo además una disminución en el riesgo

de desarrollo de resistencia bacteriana al permitir una completa adherencia de los pacientes a la farmacoterapia.

2.2 Aportación científica

Síntesis de biomateriales cerámicos que permitan la liberación prolongada de ciprofloxacino con potencial para el desarrollo de implantes que puedan ser utilizados en el tratamiento y profilaxis de infecciones osteoarticulares.

2.3 Hipótesis

El ciprofloxacino incorporado en una matriz de SiO_2 mesoestructurada sintetizada vía sol-gel se liberará en forma sostenida en un tiempo mayor a 120 horas.

2.4. Objetivo general

Sintetizar biomateriales cerámicos mesoporosos de sílice utilizando pluronic como plantilla y evaluar sus propiedades para la liberación prolongada de ciprofloxacino.

2.4.1 Objetivos específicos

- Obtener biomateriales cerámicos que contengan ciprofloxacino en forma de polvos y películas sintetizados vía sol-gel a dos concentraciones del precursor alcóxido.
- Obtener biomateriales cerámicos mesoestructurados que contengan ciprofloxacino en forma de películas y polvos sintetizados vía sol-gel utilizando el tensoactivo pluronic como plantilla mesoestructurada.
- Caracterizar los biomateriales sintetizados por diferentes técnicas térmicas, espectrométricas y microscópicas.

- Evaluar *in vitro* la cinética de liberación de ciprofloxacino de los biomateriales en solución a pH fisiológico.
- Evaluar *in vitro* la liberación de ciprofloxacino de los biomateriales mediante la medición de su actividad antimicrobiana utilizando un cultivo de *P. aeruginosa*

2.5 Metas

- 1) Obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia en el tiempo establecido.
- 2) Divulgar los resultados de la investigación en congresos nacionales y/o internacionales.
- 3) Redactar un artículo de los resultados para su publicación en una revista científica internacional.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos y equipos

- ✓ Principio activo: Ciprofloxacino $C_{17}H_{18}FN_3O_3$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- ✓ Alcóxido: Tetraetilortosilicato (TEOS), $SiC_8H_{20}O_4$ 98% (Grado RA, Sigma-Aldrich)
- ✓ Solvente: Alcohol etílico 99.6% (Desarrollo de Especialidades Químicas, S.A. de C.V.)
- ✓ Pluronic® P-123: $HO(CH_2CH_2O)_{20}(CH_2CH(CH_3)O)_{70}(CH_2CH_2O)_{20}H$ (Sigma-Aldrich)
- ✓ Ácido clorhídrico 37.40% (Desarrollo de Especialidades Químicas, S.A. de C.V.)
- ✓ Ácido fosfórico 85% (CTR Scientific)
- ✓ Trietilamina $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich)
- ✓ Acetonitrilo (Grado HPLC, TEDIA)

La caracterización de los materiales se desarrolló en instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas y del Instituto de Ingeniería Civil de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de equipos para caracterización y ubicación

EQUIPO	UBICACIÓN
Espectrómetro infrarrojo Spectrum one Perkin Elmer	Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Ciencias Químicas (FCQ)
Analizador térmico diferencial/termogravimétrico TA Instruments SDT Q600	Departamento de Ecomateriales y Energía, Instituto de Ingeniería Civil
Difractómetro de rayos X Siemens D-500	Departamento de Ecomateriales y Energía, Instituto de Ingeniería Civil
Microscopio electrónico de barrido JSM- 6701F, equipado con una sonda para EDS	Departamento de Ecomateriales y Energía, Instituto de Ingeniería Civil
Quantachrome Autosorb-1 AS-1C2	Departamento de Ecomateriales y Energía, Instituto de Ingeniería Civil
Perfilómetro Bruker Dektak 150, Veeco	Instituto de Física “Ing. Luis Rivera Terrazas”, BUAP
Malvern Zetasizer Nano ZS90	Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Universidad de Chile

3.2 Metodología general

La metodología empleada en este trabajo se divide en tres etapas. La primera corresponde a la síntesis de los biomateriales en forma de películas y polvos por la técnica de sol-gel, realizando la incorporación del ciprofloxacino ya sea por impregnación o durante la síntesis. La segunda etapa implica la caracterización de los biomateriales. La última etapa corresponde a la evaluación *in vitro* de la cinética de liberación del fármaco en solución amortiguadora de fosfatos y mediante la determinación del efecto bactericida.

3.2.1 Síntesis del biomaterial

En las condiciones para llevar a cabo la síntesis de los biomateriales vía sol-gel variando la relación de precursores y la cantidad de solvente (Tabla 4).

Se llevó a cabo a pH de 3 (pH en el que se presenta principalmente la polimerización lineal, lo que puede favorecer la formación de películas), se modificó la relación molar alcóxido/agua, ya sea 1:6 o 1:8, y se probaron diferentes relaciones molares alcóxido/alcohol. El ciprofloxacino se incorporó al 20% de dos maneras: durante la formación del sol en la síntesis de la matriz cerámica y después de la síntesis por técnica de impregnación. La síntesis de las películas de sílice se realizó por la técnica de recubrimiento por inmersión (dip coating). A partir de la formación del sol, se realizaron las películas sobre portaobjetos.

Tabla 4. Condiciones de síntesis de los biomateriales

	pH de síntesis	Relación TEOS/H ₂ O	Forma de incorporar el fármaco	Pluronic*	Referencia en el texto
Películas de sílice	3	1:6	Durante la síntesis	No	Peli:1:6:Cipro
			Por impregnación	No	Peli:1:6:CiproIM
				Sí	Peli:1:6:PLU:CiproIM
		1:8	Durante la síntesis	No	Peli:1:8:Cipro
			Por impregnación	No	Peli:1:8:CiproIM
				Sí	Peli:1:8:PLU:CiproIM
Polvo	3	1:6	Durante la síntesis	No	1:6:Cipro
			Por impregnación	No	1:6:CiproIM
				Sí	1:6:PLU:CiproIM
		1:8	Durante la síntesis	No	1:8:Cipro
			Por impregnación	No	1:8:CiproIM
				Sí	1:8:PLU:CiproIM

3.2.1.1 Síntesis del biomaterial en polvo

La metodología para la síntesis de los materiales mesoporosos (Figura 1) comienza con la mezcla del TEOS con el 50% del total del alcohol etílico manteniendo en agitación por un lapso de 10 minutos, posteriormente se inició

con la hidrólisis añadiendo gota a gota la mezcla de agua con el resto de alcohol, se ajustó el pH a 3 con ácido clorhídrico 0.1 M (añadiendo gota a gota). Se dejó agitando por 2 horas y después se mantuvo a temperatura ambiente en un vaso de precipitado cerrado hasta la formación del gel. Una vez obtenido el gel, se dejó envejecer por 24 horas a temperatura ambiente y después se secó a una temperatura de 90°C hasta la formación del xerogel. Posteriormente, el xerogel obtenido fue molido en un mortero para homogeneizarlo y se sometió a un tratamiento térmico a una temperatura de 400°C por 4 horas con una rampa de calentamiento de 10°C/min.

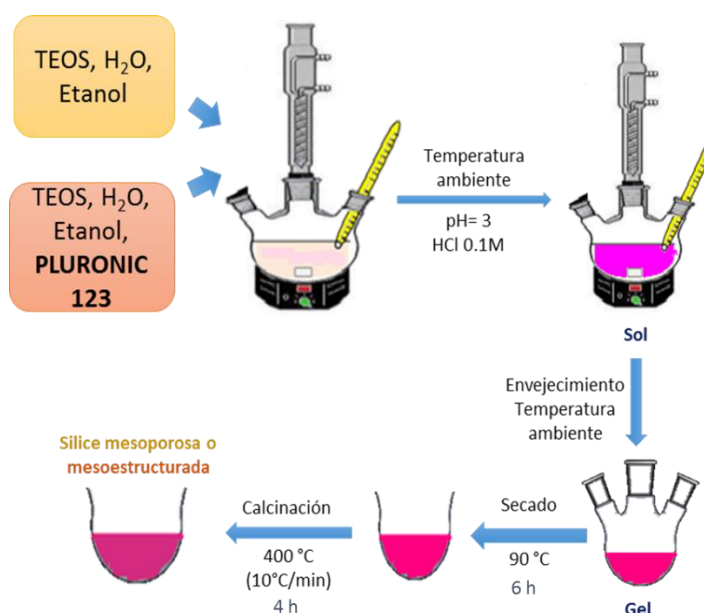


Figura 1. Esquema general para la síntesis de materiales de sílice mesoporosa o mesoestructurada en polvo

Para la obtención de los biomateriales mesoestructurados (Figura 1) sintetizados utilizando pluronic como plantilla, se siguió el mismo procedimiento con la diferencia de que primero se disolvió el pluronic P-123 (Figura 2) en el 50% del alcohol, después se añadió el TEOS y posteriormente la solución de agua y el resto del alcohol fue añadida gota a gota y se ajustó el pH. Obtenido el gel, se llevó a las mismas condiciones de envejecimiento, secado y tratamiento térmico.

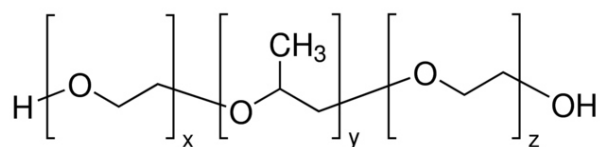


Figura 2 . Estructura del tensoactivo Pluronic P-123 ($x=20$, $y=70$, $z=20$)

3.2.1.2 Síntesis del biomaterial en películas

Para la síntesis de los biomateriales en forma de películas se siguió el mismo procedimiento de síntesis descrito anteriormente. La deposición de las películas por el método de dip-coating se hizo a partir del sol después de 24 horas de empezada la reacción de hidrólisis.

Se realizó el ajuste de la velocidad de inmersión en el sol (1.9 cm/s), el tiempo de estancia (10 s) y la velocidad de extracción (0.52 cm/s). Se utilizaron portaobjetos de vidrio (medidas 75 x 38 mm, espesor 0.90-1.10 mm) como soporte para la deposición del material en películas.

Después de la deposición del sol en el soporte, se secó a temperatura ambiente y posteriormente se sometió a un tratamiento térmico a 400°C por un lapso de 4 horas con una rampa de calentamiento de 10°C/min. Este proceso fue repetido varias veces para obtener la mayor cantidad de biomaterial depositado, se pesó el soporte antes y después de cada deposición (Figura 3).

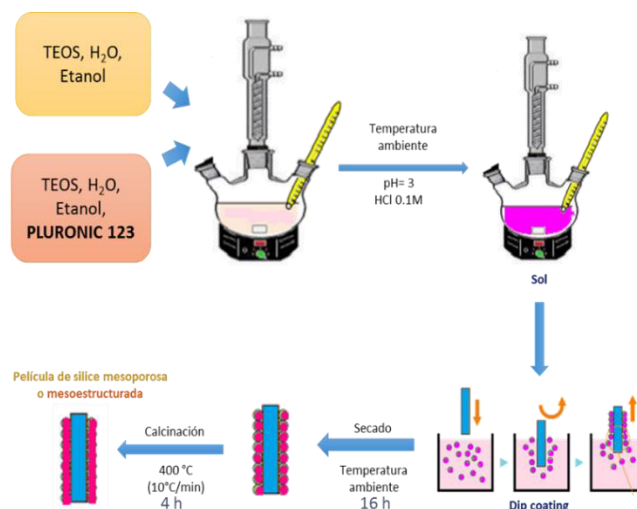


Figura 3. Esquema general para la síntesis de películas de sílice mesoporosa o mesoestructurada

Se midió el espesor de las películas mediante la técnica de perfilometría utilizando un perfilómetro Bruker Dektak 150 Veeco.

3.2.2 Forma de incorporar el fármaco

3.2.2.1 Incorporación del fármaco durante la síntesis

Los materiales mesoporosos a los cuales se les incorpora ciprofloxacino durante la síntesis se obtuvieron mezclando inicialmente el 20% de ciprofloxacino correspondiente en peso de la cantidad de material con el total de alcohol etílico colocando la mezcla en agitación y adicionando el TEOS, posteriormente se inició con la hidrólisis añadiendo gota a gota el agua, se ajustó el pH a 3 con ácido clorhídrico 0.1 M. Se dejó agitando por 2 horas y después se mantuvo estático a temperatura ambiente en un vaso de precipitado cerrado hasta la formación del gel. Una vez obtenido el gel, se dejó envejecer por 24 horas a temperatura ambiente y después se secó a una temperatura de 90°C hasta la formación del xerogel. Se homogeneizó el biomaterial y se sometió a un tratamiento térmico a una temperatura de 200°C por 4 horas con una rampa de calentamiento de 10°C/min.

3.2.2.2 Incorporación del fármaco por impregnación

La impregnación de los materiales mesoporos y mesoestructurados en forma de polvos y películas se realizó adicionando la cantidad de ciprofloxacino correspondiente al 20% y se disolvió en ácido clorhídrico 0.01 M, se colocó en agitación y posteriormente se añadió el material. Se mantuvo en agitación por 48 h y posteriormente se secó a 50°C.

3.2.3 Caracterización de los biomateriales

3.2.3.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Los espectros de absorción de infrarrojo se registraron en un espectrómetro infrarrojo Spectrum one Perkin Elmer. El barrido espectral por ATR se realizó en un intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} .

3.2.3.2 Análisis térmico diferencial y termogravimétrico (ATG-ATD). Se llevó a cabo en un analizador térmico diferencial/termogravimétrico TA Instruments SDT Q600, las mediciones se realizaron en un rango de 25-800 °C, con atmósfera de aire y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

3.2.3.3 Difracción de rayos X (DRX). Se realizó para analizar la estructura cristalina de la sílice mediante un difractómetro de rayos X Siemens D-500. La intensidad de difracción se midió en un intervalo del ángulo 2θ de 5° a 90°, con un tamaño de paso de 0.02°.

3.2.3.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) para conocer la morfología de los biomateriales y de la sílice, las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido JSM-6701F, este instrumento está equipado con una sonda para EDS, el cual indica la composición química de las muestras. Se utilizó

cinta de cobre para fijar las muestras y se les realizó un recubrimiento con oro y paladio.

3.2.3.5 Análisis textural: BET-BHJ. Se calculó el área superficial específica y porosidad a partir del método BET (Brunauer-Emmett-Teller) y el BJH (Barret-Joiner-Halenda). Las isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno se obtuvieron usando el equipo Quantachrome Autosorb-1 AS-1C2. Antes de obtener las isothermas, las muestras fueron desgasificadas al vacío por 48 horas a 90°C.

3.2.4 Identificación y cuantificación de ciprofloxacino

La cuantificación de ciprofloxacino inicialmente se llevó a cabo por espectrofotometría UV-Vis, posteriormente se decidió utilizar para la identificación y cuantificación del fármaco la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ya que es una de las técnicas más indicadas para el análisis y control de medicamentos de las Farmacopeas Oficiales, como la USP (Pharmacopeia of United States of America) y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

3.2.4.1 Cuantificación de ciprofloxacino por espectrofotometría UV-Vis

La cuantificación de ciprofloxacino se llevó a cabo por medio de espectrofotometría UV-Vis en un espectrofotómetro Varian Cary 50. Para conocer la longitud de onda de máxima absorción de ciprofloxacino se preparó una solución de 10 µg/mL (10 ppm) y se registró el espectro de absorción UV-Vis.

La solución stock de referencia se preparó pesando una cantidad de 10 mg de ciprofloxacino, colocándola en un matraz volumétrico de 100 mL, y disolviendo con HCl 0.1M, para obtener una concentración final de 100 µg/mL.

3.2.4.1.1 Curva de calibración por espectrometría UV-Vis

Se realizó una curva de calibración con 6 estándares a partir de la solución stock, se tomaron diferentes volúmenes desde 0.5 hasta 2 mL, las alícuotas se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL, se aforaron con HCl 0.1 M y se mezclaron. La preparación de cada uno de los estándares se realizó por triplicado. Se llevaron a cabo las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 277.0 nm.

3.2.4.2 Cuantificación de ciprofloxacino por HPLC-UV

Se realizó la cuantificación de ciprofloxacino por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en un HPLC Waters Alliance 2695 System con detección UV (Photodiode Array Detector) (Figura 4); se llevó a cabo en fase reversa, utilizando una columna Microsorb-MV 100-5 C18 (250 x 4.6mm). La fase móvil se preparó de acuerdo a lo establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de ácido fosfórico 0.025 M, ajustado previamente con trietilamina a pH 3.0 ± 0.1 ; acetonitrilo (87:13), se filtró y degasificó.



Figura 4. HPLC Waters Alliance 2695 System con detección UV

Se preparó una solución stock de referencia de 100 mg/L (100 ppm) de ciprofloxacino con fase móvil. Se prepararon ocho estándares de 0.3, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 y 30 ppm por triplicado para la curva de calibración partiendo de la solución stock, se hicieron las diluciones correspondientes aforando con fase móvil.

Para conocer la longitud de onda de máxima absorción de ciprofloxacino se registró el espectro de absorción UV-Vis en un espectrofotómetro (Varian Cary 50), encontrando que tiene un máximo de absorción a la longitud de onda de 278 nm. El volumen de inyección fue de 10 µL, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y la señal de ciprofloxacino en el cromatograma se presentó con un tiempo de retención de 2.57 minutos. El sistema se calibró en un rango de presión entre 1690 y 1730 PSI.

Los datos obtenidos se analizaron a través del software Excel con el que se hicieron las curvas de calibración y los cálculos necesarios (coeficiente de correlación, porcentaje de error, LD, LC) para determinar los parámetros analíticos de validación.

3.2.5 Pruebas de extracción

Para determinar el porcentaje de ciprofloxacino incorporado en cada uno de los biomateriales sintetizados vía sol-gel, se llevaron a cabo pruebas de extracción. Los diferentes biomateriales ya sea en polvos o películas fueron sometidos a agitación mecánica en el equipo Incubator shaker LAB-LINE®.

Las condiciones de trabajo para evaluar la máxima cantidad liberada a partir de cada uno de los materiales fueron la utilización de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.1, como solvente extractor, agitando a una velocidad de 100 rpm y manteniendo la temperatura a 37°C. Se consideraron dos tiempos de muestreo a 24 h y 48 h. Una vez que transcurrió el tiempo, se tomó

una alícuota de cada muestra, se filtró y se prepararon para ser inyectadas en HPLC, posteriormente se cuantificó el porcentaje de extracción de ciprofloxacino.

3.2.6 Evaluación de la liberación de ciprofloxacino

3.2.6.1 Evaluación de la cinética liberación *in vitro* mediante la adaptación del método de perfil de disolución

Las pruebas de liberación *in vitro* se realizaron por triplicado con los biomateriales sintetizados con pluronic de relación TEOS/H₂O 1:6 y 1:8 que incorporan ciprofloxacino por impregnación mediante un sistema estático a temperatura ambiente. El medio de disolución fue una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.1 para simular el pH fisiológico que se encuentra a nivel de tejido muscular, la cual se preparó mediante la mezcla de una solución de fosfato monobásico de potasio 9.08 g/L con una solución de fosfato dibásico de sodio 9.46 g/L (39:61), ajustado al pH con NaOH 0.2M. Se colocó en vasos de precipitado 50 mL del medio, se añadieron los biomateriales y se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos sin reposición del medio (Tabla 5). La detección y cuantificación del ciprofloxacino se realizó mediante HPLC con detector UV a una longitud de onda de 278 nm.

Tabla 5. Tiempos de muestreo para la cinética de liberación

Días/Horas						
0.04/1	0.5/12	1/24	2/48	3/72	4/96	5/120

3.2.6.2 Evaluación de la liberación mediante la determinación del efecto bactericida

Se realizaron estudios de liberación de ciprofloxacino utilizando cultivos bacterianos de *P. aeruginosa* por el método de difusión en disco para asegurar que la actividad del antibiótico se conserva después de exponerse a las condiciones de síntesis de los biomateriales. A partir de las alícuotas de 1 mL de

las pruebas liberación *in-vitro* en solución se almacenaron 500 µL de esta en tubos eppendorf estériles para la evaluación de la actividad bactericida.

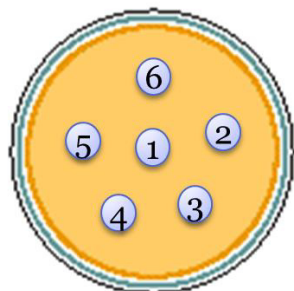
La reactivación de la cepa de *P. aeruginosa*, se llevó a cabo un día antes del ensayo, mediante la inoculación de las bacterias suspendidas en el medio de cultivo líquido en un tubo con medio de cultivo sólido, incubando a 37°C por 12 horas.

La preparación del medio de cultivo consistió en pesar 12.6 g de Agar Muller-Hinton y 9 g de Agar Bacteriológico, se les añadió 600 mL de agua destilada y sometió a agitación y calentamiento hasta obtener un medio transparente. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min a 1 atm de presión. Se realizó el vaciado en placas de Petri de plástico estériles y se dejó solidificar.

Para la preparación del inóculo, se añadió al tubo de la cepa reactivada 3 mL de solución salina al 0.85% y se suspendieron las bacterias, se tomó 1 mL de la suspensión con las bacterias y se transfirió a un tubo con 6 mL de solución salina, se homogeneizó y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 630 nm, se ajustó para obtener una absorbancia de 250 que es equivalente a tener una concentración de 3×10^8 células/mL. Se depositaron 200 µL de esta solución en cada caja de Petri y se distribuyeron con un asa de vidrio para garantizar la inoculación de toda la superficie.

La prueba de difusión se llevó a cabo utilizando discos de papel filtro de 0.6 cm de diámetro, cada disco se impregnó con 10 µL de las alícuotas del perfil de liberación *in vitro*, para el blanco se utilizaron discos impregnados con solución amortiguadora de fosfatos, al que se le agregó sílice sin antibiótico. Los discos impregnados se colocaron sobre la superficie del agar utilizando pinzas, sin mover el disco una vez que haya entrado en contacto con la superficie de agar.

Se colocaron 6 discos (0.6 cm de diámetro) en cada caja de Petri: 3 repeticiones de la muestra y 3 repeticiones del estándar (Figura 5).



Disco	Muestra
1, 2, 3	Triplicado alícuota
4, 5, 6	Triplicado estándar

Figura 5. Esquema de la ubicación de los discos en las caja de petri

Se sembraron 28 placas con el microorganismo, se utilizaron siete placas para cada material, una para cada tiempo de muestreo (Tabla 6). Una vez que los discos se colocaron, las cajas se incubaron a 37 °C durante 15 horas. Posteriormente se midió el halo de inhibición comparando los resultados de las muestras con los estándares.

Tabla 6 . Placas sembradas para cada material

Placa	Alícuotas del Tiempo (h)	Concentración Estándar (ppm)
t1	1	0.5
t2	12	1
t3	24	5
t4	48	10
t5	72	30
t6	96	15
t7	120	20

3.2.7 Método alternativo de síntesis de nanopartículas de sílice y modificación de sus propiedades por funcionalización.

3.2.7.1 Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa por el método de Arriagada y col.

A partir del método de Arriagada y colaboradores se sintetizaron nanopartículas de sílice con y sin CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Figura 6) .¹⁰ Para la síntesis sin tensoactivo, se añadieron lentamente 1.73 mL de TEOS a una mezcla de 44 mL de etanol, 2.98 mL de agua desionizada y 1.28 mL de amoníaco en un matraz de fondo redondo a temperatura ambiente con agitando por 3 horas y la dispersión resultante se lavó con varias porciones de etanol seguido de centrifugación y resuspensión en etanol grado HPLC. En la síntesis de nanopartículas con tensoactivo se añadieron 3 mg de CTAB a la mezcla de etanol agua y amoniaco y posteriormente se añadió el TEOS gota a gota, se agitó y se mantuvo el sistema a temperatura ambiente por 3 horas. Después se les añadió 3 mL de HCl al 37% y se mantuvo bajo agitación y reflujo a 60°C durante 15 h. La suspensión resultante se lavó con varias porciones de etanol, seguido de centrifugación y resuspensión en etanol grado HPLC.

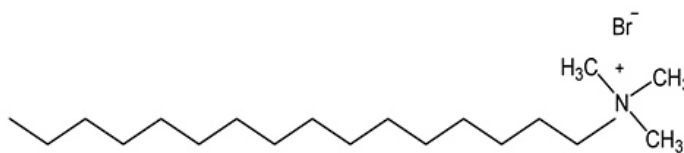


Figura 6 . Estructura de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)

3.2.7.2 Funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa

Las nanopartículas con y sin tensoactivo dispersas en etanol se centrifugaron y se resuspendieron en 5 mL de acetona para su posterior funcionalización con (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) (Figura 7). Se añadieron las nanopartículas en acetona a 50 mL de tolueno y se añadieron gota

a gota 0,8 mL de APTES. La mezcla se calentó con agitación y reflujo durante 3h y se mantuvo 12 h solo con agitación. Las nanopartículas se lavaron y centrifugaron varias veces con porciones de tolueno, tolueno:acetona, acetona:etanol y etanol y se almacenaron nuevamente en suspensión en etanol grado HPLC.

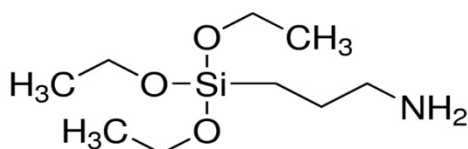


Figura 7 . Estructura de (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES)

3.2.8 Pruebas de adsorción de ciprofloxacino en nanopartículas de sílice mesoporosa sintetizada por el método de Arriagada y col.

3.2.8.1 Incorporación de ciprofloxacino en nanopartículas

La incorporación del fármaco se llevó a cabo agregando 20 mg de ciprofloxacino, disueltos en 5 mL de agua acidificada con HCl al 37%, y se añadieron 20 mL de una suspensión etanólica de cada tipo de nanopartículas. La mezcla se agitó a 100 rpm por 48 h y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos, después de esto, se obtuvieron alícuotas para el determinar la concentración de fármaco residual mediante HPLC, la diferencia con la cantidad de ciprofloxacino añadido corresponde al adsorbido en las nanopartículas de sílice.

3.2.8.2 Cuantificación de ciprofloxacino para nanopartículas

Se realizó la cuantificación de ciprofloxacino por HPLC, empleando el equipo HPLC Shimadzu 20A System con detección UV/VIS del Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Universidad de Chile (Figura 8); el análisis se llevó a cabo en fase reversa, utilizando una columna C18 (150 x 4.6mm). La

fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de ácido acético al 2% y acetonitrilo (86:14), filtrada y desgasificada.



Figura 8. HPLC Shimadzu 20A System con detección UV/VIS

Se preparó una solución stock de referencia de 2000 mg/L (2000 ppm) de ciprofloxacino en HCl 0.01M. Se prepararon seis estándares de 15, 50, 100, 300, 600 y 720 ppm por triplicado para la curva de calibración partiendo de la solución stock, se hicieron las diluciones correspondientes aforando con agua.

Se encontró la longitud de onda de máxima absorción de ciprofloxacino a 279 nm. El volumen de inyección fue de 10 μ L, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y la señal de ciprofloxacino en el cromatograma se presentó con un tiempo de retención de 2.57 minutos. El sistema se calibró en un rango de presión entre 50-60 BAR. Los datos obtenidos se analizaron a través del software Excel.

3.2.9 Caracterización de nanopartículas de sílice sintetizadas por el método de Arriagada y col.

3.2.9.1 Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta

El tamaño promedio de partícula y el potencial Zeta de las nanopartículas sintetizadas se determinaron usando un Malvern Zetasizer Nano ZS90. Las muestras se diluyeron con etanol y buffers a diferentes pH.

3.2.9.2. Determinación del mecanismo de adsorción de ciprofloxacino en las nanopartículas mediante modelos isotérmicos

La determinación de la isoterma de adsorción fue realizada añadiendo una cantidad fija de nanopartículas en solución (50 mg/10 mL etanol) a cantidades variables de ciprofloxacino (0.5-8 mg). Se agitaron los contenidos del matraz por 24 h posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos para obtener alícuotas para el análisis de concentración mediante HPLC. La cantidad de carbono adsorbido en el equilibrio frente a la superficie de las nanopartículas se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (\text{Ec.6})$$

Donde q_e es la cantidad de ciprofloxacino adsorbida por unidad de cantidad de nanopartícula en equilibrio (mg/g), C_0 y C_e son las concentraciones en solución en solución antes y después de la adsorción respectivamente (mg/L), V es el volumen del medio (L) y m es la masa de nanopartículas (g).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Biomateriales sintetizados

4.1.1 Biomateriales sintetizados en forma de polvo

La síntesis se realizó en un medio ácido a un pH de 3. Se siguió la misma ruta de síntesis para los biomateriales en polvos o películas. Se probaron dos cantidades de TEOS y tres relaciones molares TEOS/Etanol y se observó que el tiempo de gelación varía en función de las condiciones de síntesis (Tabla 6), el tiempo de gelación presentó un comportamiento dependiente de la cantidad de TEOS y no estuvo directamente relacionado con la cantidad de alcohol etílico, ya que el mayor tiempo de gelación se presentó al utilizar la menor cantidad de TEOS y la mayor proporción de alcohol etílico el tiempo de gelación aumentó, mientras que la gelación ocurrió en menor tiempo al utilizar la mayor cantidad de TEOS y una proporción intermedia de alcohol etílico.

La gelación rápida es desfavorable debido a que para la obtención de películas es necesario que el sol se mantenga transparente y estable por mayor tiempo, para obtener mayor cantidad de deposiciones sobre los portaobjetos. El tiempo de gelación varió ampliamente en los materiales sintetizados, los valores fluctúan entre los 5 y 50 días, siendo los menores para la relación TEOS/Etanol 1:5, cuando la cantidad de TEOS utilizada fue de 14 g, para ambas relaciones molares TEOS/agua, 1:6 y 1:8 (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de síntesis probadas y tiempos de gelación

Relación molar TEOS/agua	Cantidad de TEOS	Relación molar TEOS/etanol	Pluronic	Tiempo de gelación
1:6	8 g	1:1	-	11 días
	14 g	1:5	-	5 días
	14 g	1:10	-	26 días
1:6	8 g	1:10	4 g	37 días
1:8	8 g	1:1	-	11 días
	14 g	1:5	-	5 días
1:8	8 g	1:10	4 g	50 días
	14 g	1:5	6.9 g	5 días

Se decidió trabajar con la mayor cantidad de TEOS y la relación molar TEOS/Etanol 1:10 (Tabla 8), ya que permite que el sol permanezca estable el tiempo necesario para llevar a cabo las deposiciones. Con respecto a las relaciones molares de los precursores, al mantener constante la cantidad de alcohol etílico, la relación molar 1:8 TEOS/agua presenta tiempos de gelación menores comparados con las síntesis realizadas a la relación molar 1:6. Además, las síntesis que contienen pluronic tienen mayor tiempo de gelación con respecto a las que no tienen tensoactivo.

López T., señala que en el proceso sol-gel es de vital importancia revisar parámetros como son la relación molar TEOS/agua, el pH de la reacción, la influencia del solvente, entre otros, puesto que de ellos dependen las características fisicoquímicas finales de los materiales sintetizados. Las investigaciones acerca del efecto del agua sobre las propiedades del gel indican que cuando la relación alcóxido/agua es mayor que la requerida estequiométricamente, la reacción de hidrólisis es completa, aunque a mayor

hidrólisis se obtienen productos poliméricos altamente ramificados, además al incrementar esta relación el tiempo de reacción para la formación de gel también aumenta. Así mismo, López T., indica que al aumentar la relación TEOS/solvente el tiempo de gelación aumenta.¹³ Esto concuerda con los resultados que obtuvimos, ya que en nuestras síntesis se controlaron los parámetros como la relación TEOS/solvente y la relación TEOS/agua para aumentar el tiempo de gelación.

Tabla 8. Condiciones finales de síntesis y tiempos de gelación

Relación molar TEOS/agua	Relación molar TEOS/etanol	Pluronic (g)	Tiempo de gelación
1:6	1:10	-	26 días
1:8	1:10	-	24 días
1:6	1:10	6.9	28 días
1:8	1:10	6.9	25 días

4.1.2 Biomateriales sintetizados en forma de película

El procedimiento para la síntesis de películas se realizó de acuerdo con lo descrito en la metodología.

Se evaluó el número de inmersiones del portaobjetos dentro del sol, así mismo se calculó el peso del biomaterial depositado. Se decidió que la cantidad de biomaterial depositado en el portaobjetos fuera aproximadamente de 30 mg, correspondiente a la sílice depositada después de la calcinación, requiriendo así diferente número de deposiciones (Tabla 9). Se observó que con la relación molar 1:8 TEOS/agua se deposita mayor cantidad de material (30%) comparado con las síntesis de relación molar 1:6, lo cual se asocia a la viscosidad del sol, la cual es mayor en el sol sintetizado a una relación molar 1:8. Además, las síntesis con

pluronic favorecen la deposición del material, ya que en estos casos fue necesario un menor número de capas para lograr depositar la cantidad de material establecida.

Tabla 9. Síntesis de películas

Relación molar TEOS/agua	Relación molar TEOS/etanol	Pluronic (mol)	Número de deposiciones	Cantidad de biomaterial (mg)
1:6	1:10	-	13	29 ± 1
1:8	1:10	-	11	32 ± 1
1:6	1:10	1.16x10 ⁻³	7	28 ± 1
1:8	1:10	1.16x10 ⁻³	6	33 ± 1

El espesor de las películas formadas sobre el portaobjetos se midió por perfilometría. Los resultados mostraron que las películas sintetizadas sin pluronic obtuvieron un mayor espesor comparado con las películas sintetizadas con tensoactivo (Tabla 10), concordando con el número de deposiciones realizadas.

Tabla 10 . Espesor de las películas de relación molar 1:6

Muestra	Espesor de la película (µm)
Peli:1:6	12.047
Peli:1:6:PLU	8.957

4.2 Caracterización de los materiales

4.2.1 Análisis térmico de ciprofloxacino y de los materiales sin calcinar

4.2.1.1 Ciprofloxacino

El análisis ATG-ATD para ciprofloxacino (Figura 9) muestra un pico endotérmico en la curva de ATD aproximadamente a 275°C, el cual corresponde a la temperatura de fusión de este fármaco (268°C). El pico exotérmico que se observa aproximadamente a 550°C corresponde a la temperatura de descomposición, lo cual concuerda con la pérdida del 100% del peso en la curva de ATG.³⁵ Estos resultados dan la pauta para establecer las condiciones de tratamiento térmico para los materiales conteniendo ciprofloxacino incorporado durante la síntesis.

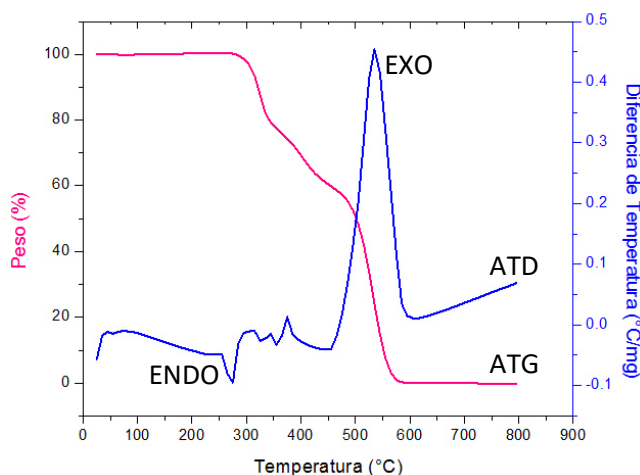


Figura 9. Análisis térmico ATG-ATD de ciprofloxacino

4.2.1.2 Materiales en fresco

En la gráfica de ATG-ATD para los materiales en fresco (antes de la calcinación) de relación molar 1:6 sin pluronic (Figura 10) se observa un pico endotérmico en la curva de ATD aproximadamente a 100 °C y concuerda con una pérdida del 15% en peso en la curva de ATG, todo esto es correspondiente con la eliminación de agua o solventes residuales utilizados en la síntesis.³⁶ Así mismo entre 200-600 °C se observa una pérdida gradual de peso atribuida a la eliminación de los grupos silanoles formados sobre la superficie.^{37,38}

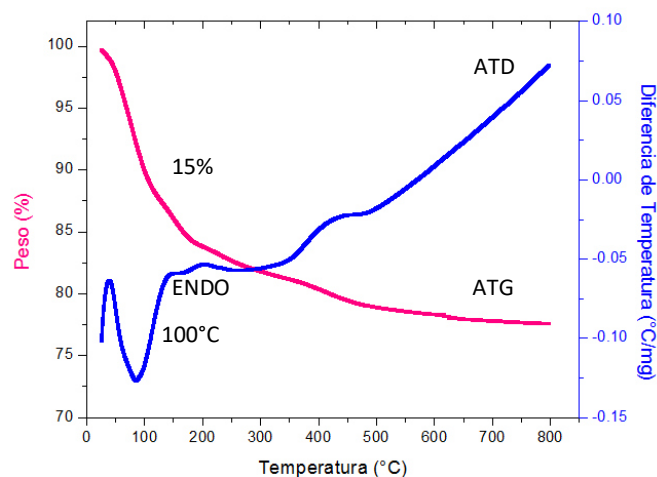


Figura 10. Análisis térmico ATG-ATD de polvos en fresco de SiO_2 relación molar 1:6

En la gráfica de ATG-ATD para los materiales en fresco de relación molar 1:6 con pluronic (Figura 11) se observa un pico endotérmico en la curva de ATD aproximadamente a 100 °C, semejante al que se presenta en los materiales que no contienen pluronic que corresponde a la eliminación de agua o solventes residuales.³⁶ Además, se observa la presencia de un pico exotérmico a 200°C con una pérdida en peso del 50% que corresponde a la combustión del pluronic y coincide con la cantidad de tensoactivo añadida. A 400°C se ha perdido la mayor proporción de peso.³⁹

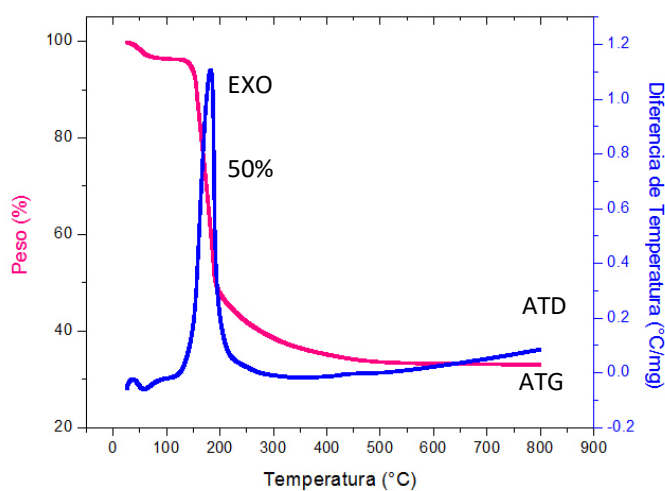


Figura 11. Análisis térmico ATG-ATD de polvos en fresco de SiO_2 con pluronic relación molar 1:6

4.2.1.3 Materiales que contienen ciprofloxacino incorporado durante la síntesis

En los resultados del análisis ATG/ATD de los biomateriales que contienen ciprofloxacino incorporado durante la síntesis (Figura 12) de relación molar TEOS/H₂O 1:6 y 1:8, se observa una primera pérdida del 20 y 30% en peso respectivamente a los 95°C, la cual es atribuida a la evaporación de residuos de la síntesis, así como a la pérdida de agua. Se observa una segunda pérdida aproximadamente a partir de los 270°C de alrededor del 15% en peso, y correspondería al comienzo de la descomposición del ciprofloxacino incorporado y a la pérdida de los grupos silanol de la estructura.^{35,37,38}

En un estudio realizado por López T. y col., se reporta una pérdida gradual a partir de la temperatura ambiente hasta aproximadamente los 100°C la cual está asociada con residuos de etanol generados en la síntesis y con la deshidratación de la sílice y del fármaco, una segunda pérdida alrededor de los 168°C se presenta por la descomposición del fármaco incorporado (Ketorolaco) y una pérdida posterior a los 200°C, la cual es atribuida a la pérdida de grupos silanol de la estructura.³⁸

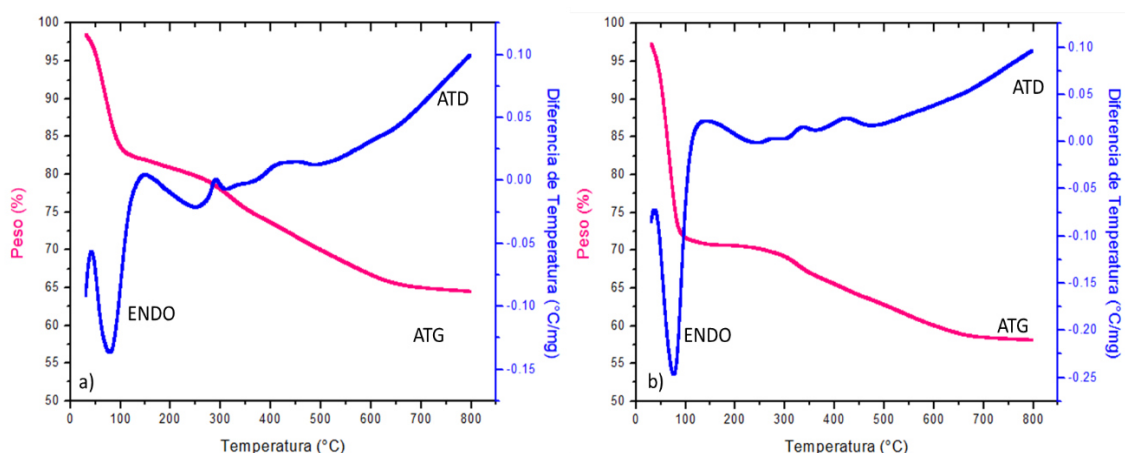


Figura 12 . Análisis térmico ATG-ATD de materiales en polvo conteniendo ciprofloxacino incorporado durante la síntesis: a) 1:6:Cipro, b) 1:8:Cipro

4.2.1.4 Materiales impregnados con ciprofloxacino

Los resultados del análisis ATG/ATD de los biomateriales impregnados con el fármaco (Figura 13) mostraron un comportamiento similar. En estas gráficas se observa una primera pérdida (5-14%) en peso aproximadamente a 95°C atribuida a la evaporación de residuos de la impregnación. Se observa también una segunda pérdida (6%) aproximadamente a partir de los 270°C, correspondiente a la temperatura de fusión del ciprofloxacino, a partir de la cual inicia la descomposición del fármaco.³⁸

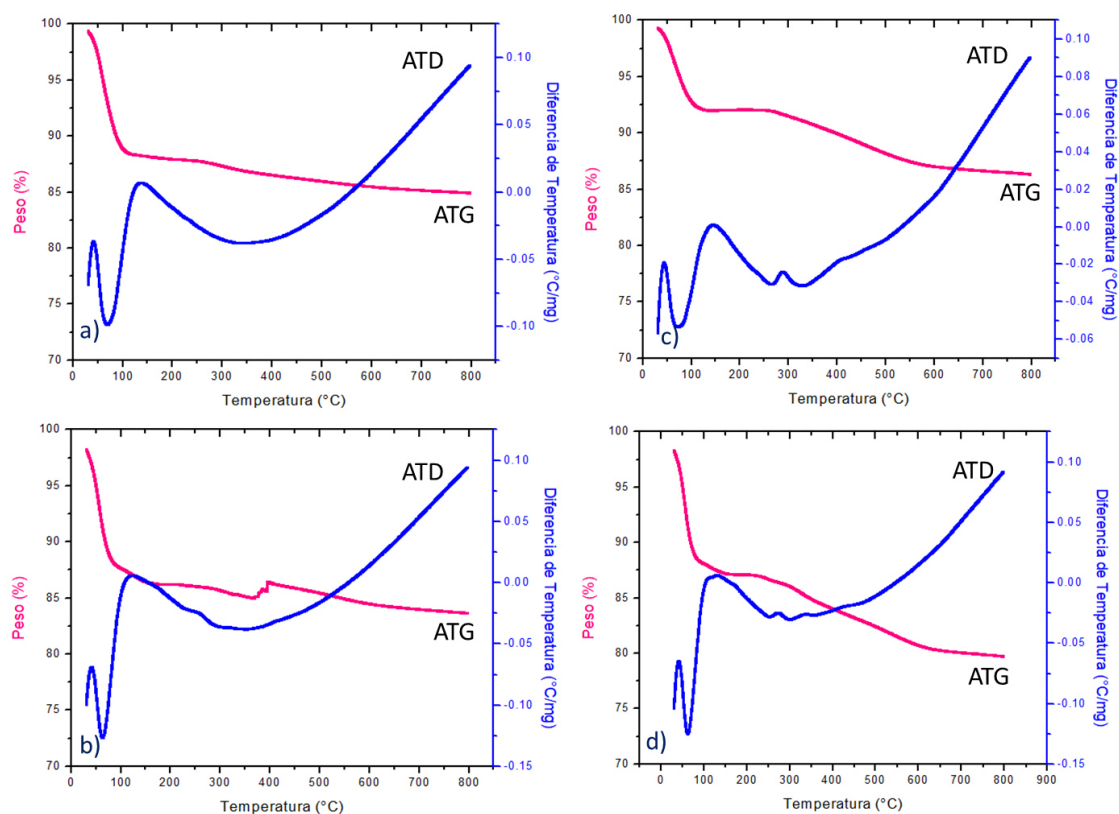


Figura 13 . Análisis térmico ATG-ATD de materiales en polvo impregnados con ciprofloxacino: a) 1:6:CiproIM, b) 1:6:PLU:CiproIM, c) 1:8:CiproIM, d) 1:8:PLU:CiproIM

4.2.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

4.2.2.1 Ciprofloxacino

El espectro infrarrojo para ciprofloxacino (Figura 14), muestra las principales bandas propias de los grupos funcionales presentes en la estructura del fármaco, las cuales corresponden a las vibraciones de estiramiento del C=O del ácido carboxílico ($\approx 1615\text{ cm}^{-1}$), del carbonilo ceto ($\approx 1588\text{ cm}^{-1}$), del grupo O-H del ácido carboxílico ($\approx 3100\text{ cm}^{-1}$), al grupo N-H de la amina secundaria ($\approx 2800\text{ cm}^{-1}$) y al estiramiento C-N ($\approx 1498\text{ cm}^{-1}$).³⁵

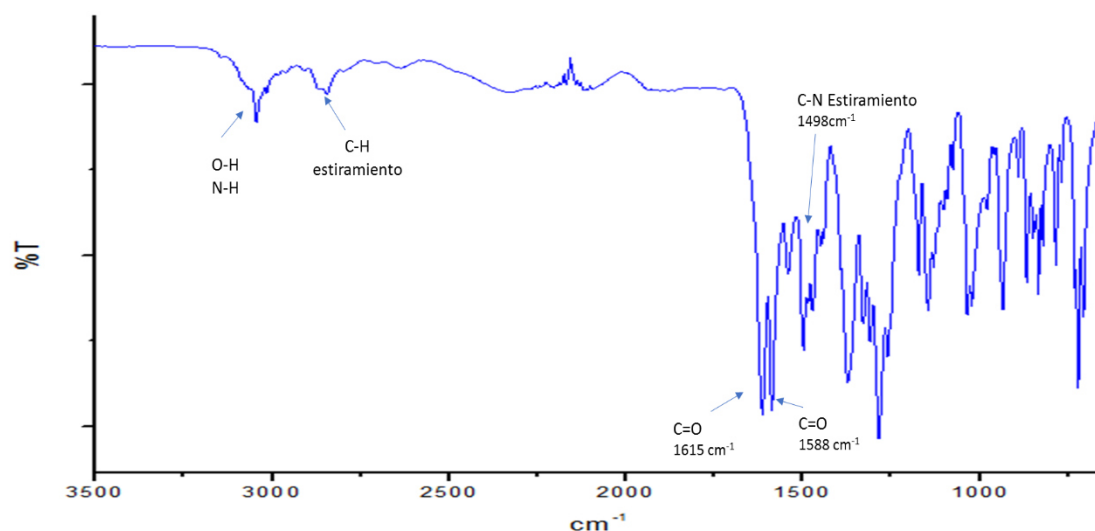


Figura 14. Espectro infrarrojo de ciprofloxacino

4.2.2.2 Espectros infrarrojo de los materiales sintetizados en forma de polvos y películas

En los espectros infrarrojo de los materiales sintetizados en forma de polvo tanto de relación molar 1:6 como 1:8 (Figura 15) se observan las bandas características de SiO_2 : banda de estiramiento y flexión del enlace O-Si-O ≈ 1064 y $\approx 793\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, y vibración del enlace entre oxígeno y el silicio del grupo silanol (Si-OH) ($\approx 939\text{ cm}^{-1}$). Además, en los materiales frescos se observa una banda débil entre $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, la cual está relacionada con el agua adsorbida y el O-H del grupo silanol. El espectro infrarrojo indica también la

completa eliminación del tensoactivo después del tratamiento térmico ya que las bandas características del pluronic, vibración de estiramiento C–H ($2800\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$) y C–H de flexión ($1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$), desaparecen después de la calcinación; la banda del pluronic entre 1200 y 1000 cm^{-1} debida a la vibración de estiramiento C–O, se sobrelapa con las bandas del grupo silanol.^{39–41} Ojeda y col., señalan que a temperaturas mayores de 350°C la materia orgánica proveniente del tensoactivo y el agua fisisorbida han sido prácticamente eliminados.³⁹

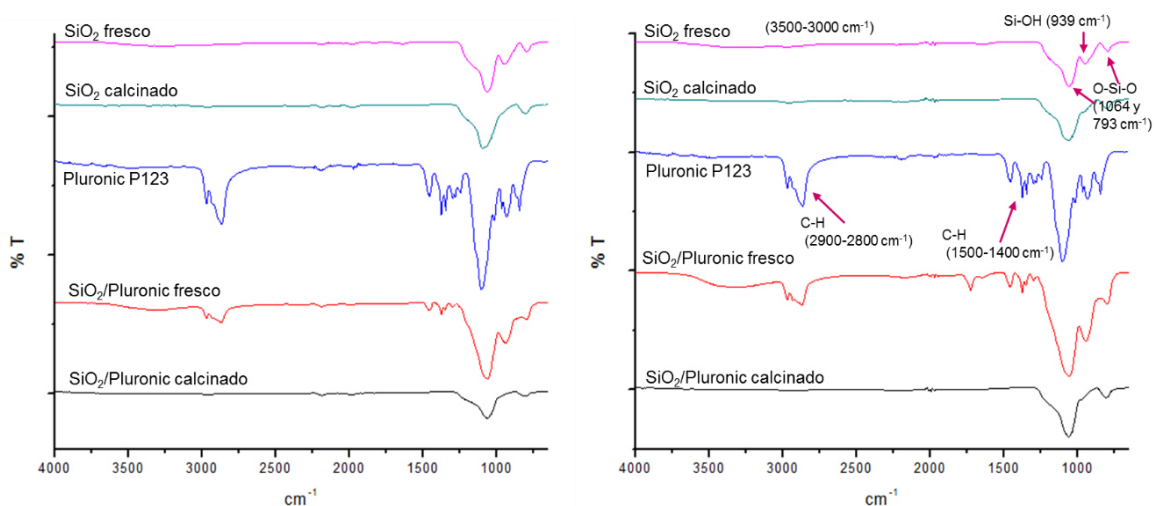


Figura 15. Espectro infrarrojo de polvos de SiO_2 de relación molar: a) 1:6, b) 1:8

Los espectros infrarrojos de los materiales sintetizados en forma de películas al igual que los polvos, muestran también las bandas características de SiO_2 , así mismo confirman la eliminación del tensoactivo después del proceso de calcinación (Figura 16).³⁹

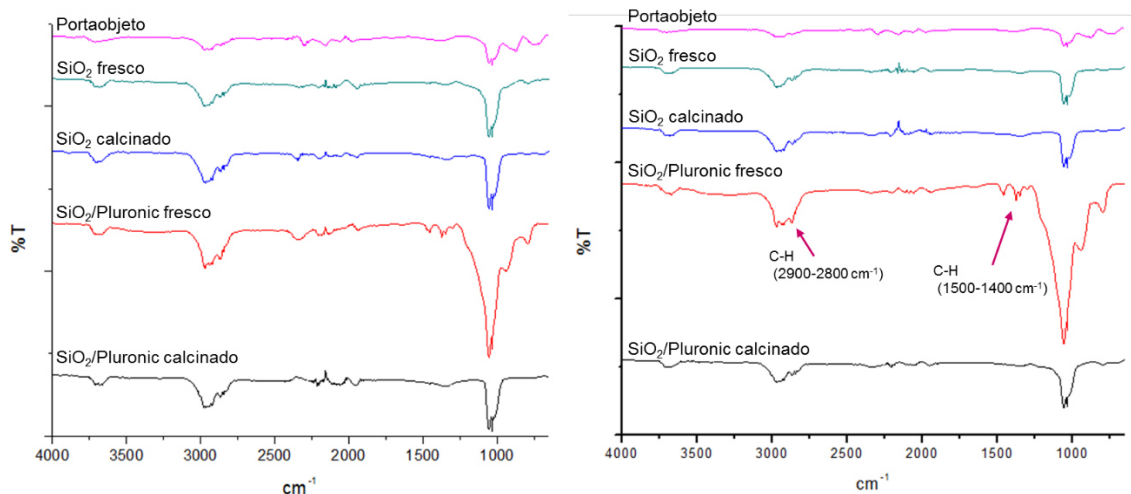


Figura 16. Espectro infrarrojo de películas de SiO_2 de relación molar: a) 1:6 b) 1:8

4.2.2.3 Espectros infrarrojo de los materiales que incorporan ciprofloxacino durante la síntesis

En los espectros FTIR de los biomateriales que incorporan ciprofloxacino durante la síntesis (Figura 17) se observan dos bandas sobresalientes alrededor de los 1630 y 1470 cm^{-1} , las cuales no se observan al hacer la comparación con el espectro de la sílice. Dichas bandas corresponden a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo del ciprofloxacino y del enlace C-N del amino respectivamente, estas señales son encontradas en cada uno de los biomateriales sintetizados.³⁵ Es esperado que las bandas se observan con menor intensidad que las observadas en el espectro del fármacos, debido a la baja proporción de ciprofloxacino incorporada en la sílice.

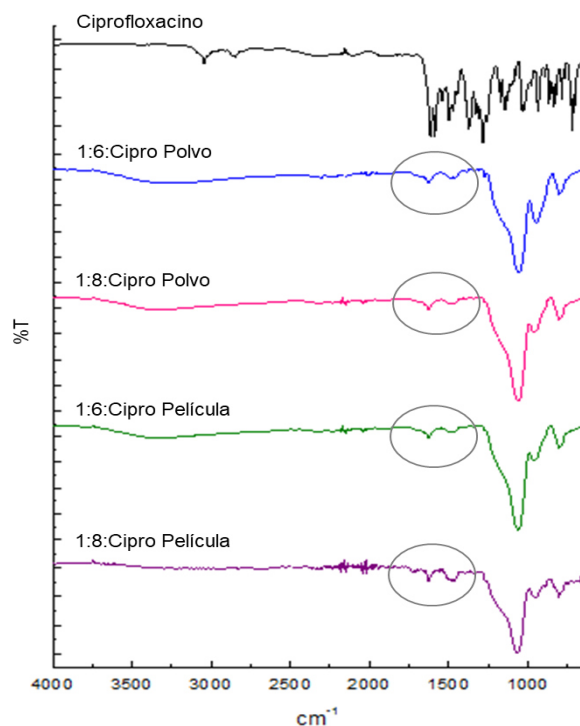


Figura 17. Espectro infrarrojo de materiales que incorporan ciprofloxacino durante la síntesis

4.2.2.4 Espectros infrarrojo de los materiales impregnados con ciprofloxacino

En los espectros FTIR de los biomateriales en polvo que incorporan ciprofloxacino por impregnación (Figura 18) se presentan las mismas dos bandas alrededor de los 1630 y 1470 cm^{-1} , correspondientes a las bandas principales de ciprofloxacino y de igual manera se presentan con baja intensidad debido a la proporción de ciprofloxacino con respecto a la sílice.³⁵

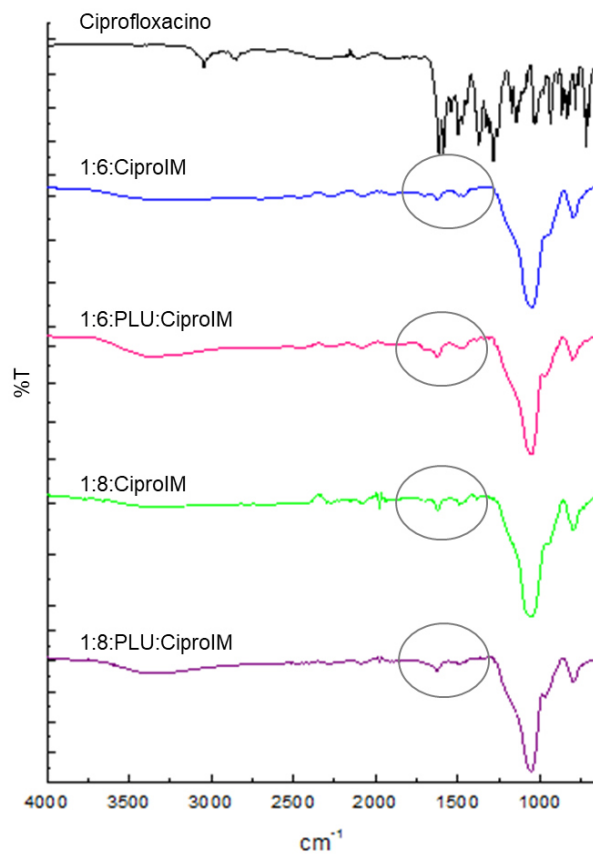


Figura 18. Espectro infrarrojo de materiales en polvo impregnados con ciprofloxacino

En los espectros FTIR de los materiales en forma de película impregnados con ciprofloxacino (Figura 19) no se observaron las dos bandas esperadas alrededor de los 1630 y 1470 cm^{-1} , correspondientes a las bandas principales del ciprofloxacino, debido probablemente a la poca cantidad de fármaco que logra incorporarse hacia las capas internas de la película durante la impregnación.

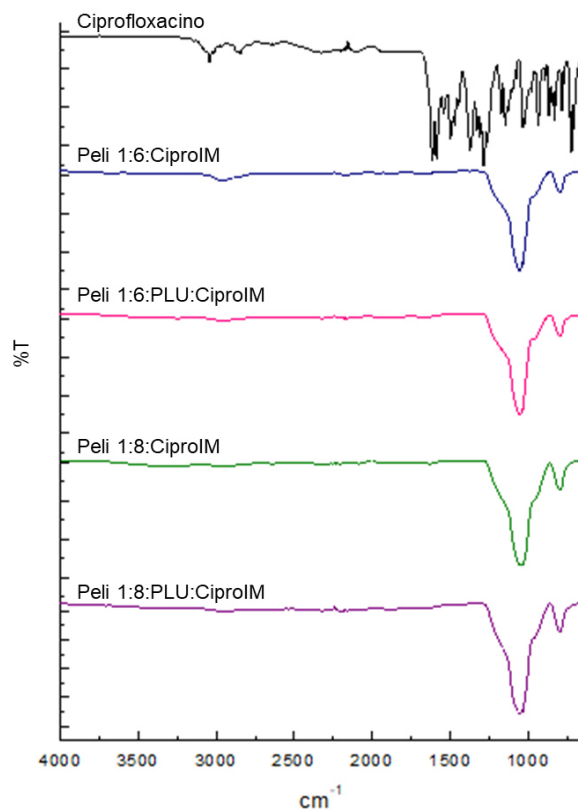


Figura 19. Espectro infrarrojo de materiales en película impregnados con ciprofloxacino

4.2.3 Difracción de rayos X

4.2.3.1 Patrón de difracción de ciprofloxacino

El patrón de difracción de ciprofloxacino (Figura 20) muestra reflexiones intensas y definidas en el ángulo 2θ de 14, 17, 18, 21, 22 y 25°, las cuales son características de su estructura cristalina.⁴²

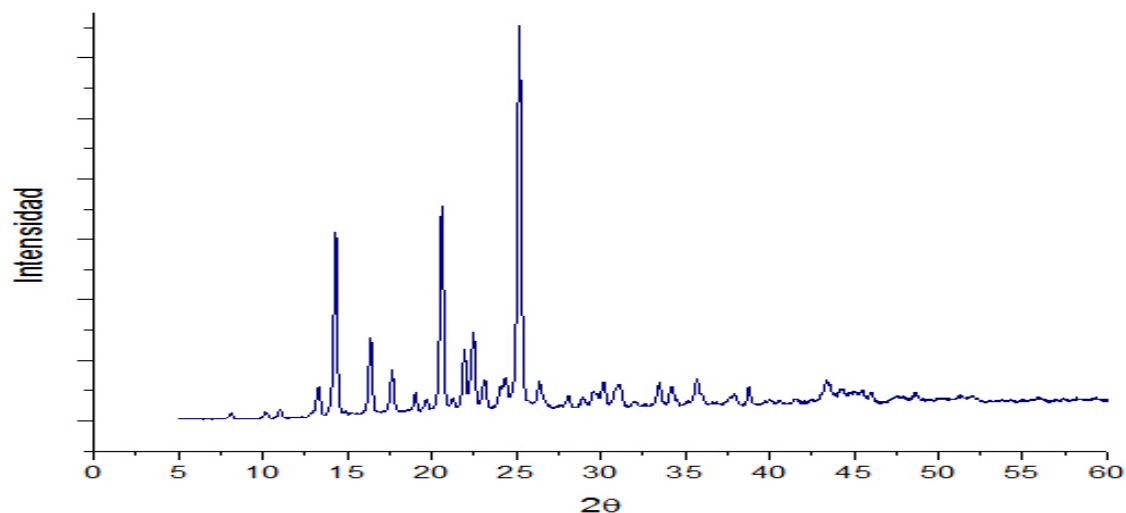


Figura 20. Patrón de difracción de rayos X de ciprofloxacino

4.2.3.2 Patrones de difracción de los materiales sintetizados

En los difractogramas de los materiales en polvo para la relación molar 1:6 y 1:8 (Figura 21) se puede observar un pico de gran amplitud entre 10-35° de 2θ , indicado que la sílice presenta una estructura híbrida amorfa, mostrando la principal reflexión a 23°. ¹⁴ El proceso de calcinación y la utilización de pluronic modifican el pico amorfo de la sílice. La intensidad del pico se incrementa cuando las muestras fueron calcinadas y también cuando se utiliza pluronic en la síntesis, lo que indica que ambas condiciones aumentan el grado de cristalinidad y el orden de la estructura.

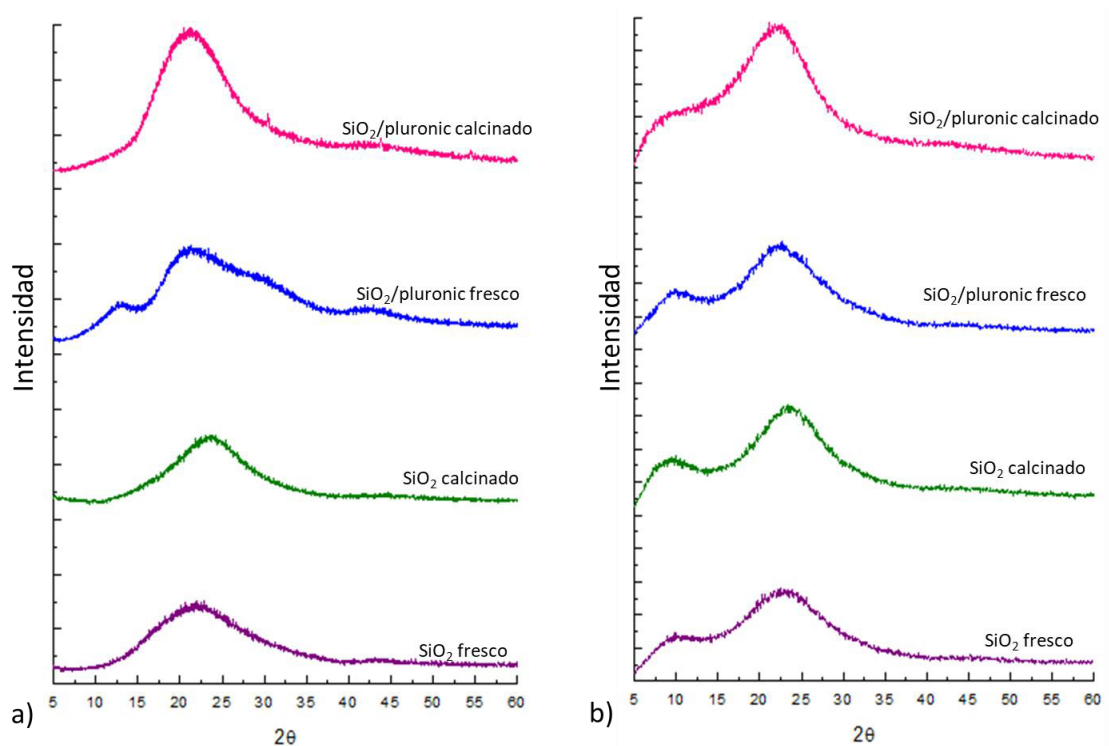


Figura 21. Patrones de difracción de rayos X de polvos de SiO_2 relación molar: a) 1:6 y b) 1:8

4.2.3.3 Patrones de difracción de los materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis

Los estudios de difracción de rayos X para los biomateriales en los que se incorpora ciprofloxacino durante la síntesis tanto de relación molar 1:6 como 1:8, revelan que algunas reflexiones de ciprofloxacino se traslapan con el pico ancho correspondiente a la matriz de SiO_2 . Se pueden observar algunas reflexiones sobresalientes a las del SiO_2 , las cuales corresponden a las reflexiones principales de ciprofloxacino y confirman la presencia del fármaco en la matriz cerámica (Figura 22).

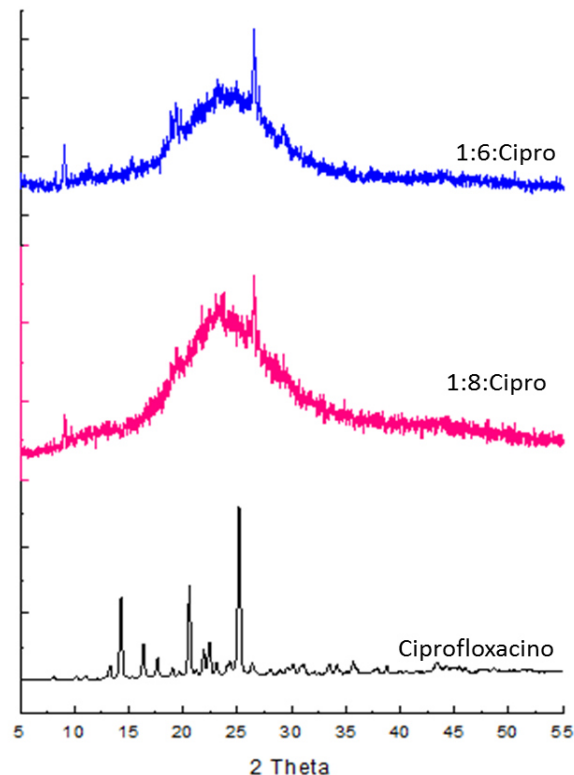


Figura 22. Patrones de difracción de rayos X de los materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis

4.2.3.4 Patrones de difracción de los materiales impregnados con ciprofloxacino

Los estudios de difracción de rayos X para los biomateriales en polvo impregnados con ciprofloxacino, al igual que los que incorporaron el fármaco durante la síntesis, revelan un traslape de las principales reflexiones de ciprofloxacino se traslapan con el pico ancho correspondiente a la matriz de SiO_2 . Se observan en todos los materiales algunas reflexiones sobresalientes a las del SiO_2 a los 44° , las cuales también aparecen en el patrón de ciprofloxacino, pero con menor intensidad, confirmando la presencia del fármaco en la matriz cerámica (Figura 23).

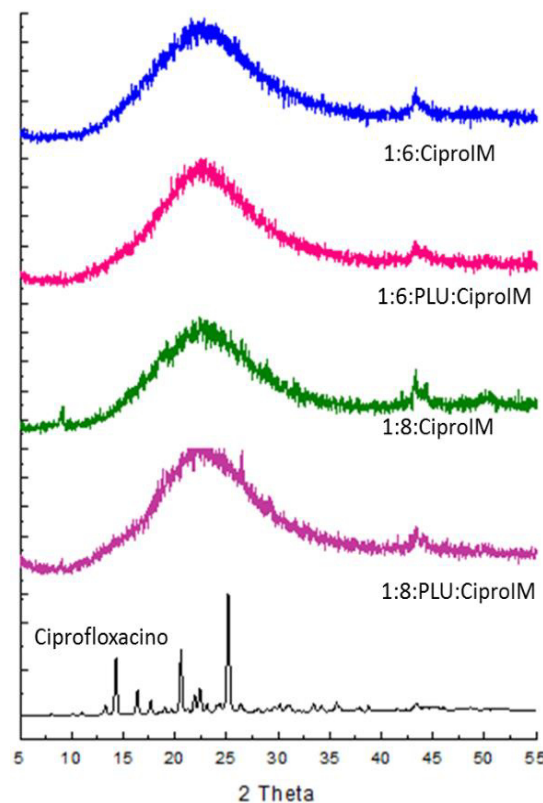


Figura 23. Patrones de difracción de rayos X de los materiales impregnados con ciprofloxacino

En los patrones de difracción de rayos X de los materiales en forma de película con y sin impregnar ciprofloxacino (Figura 24), no se observó algún cambio que indicara la presencia del ciprofloxacino en el biomaterial, lo cual puede deberse a la poca cantidad de material depositado y a la baja proporción del fármaco con respecto a la matriz. Adicionalmente se observó que en los materiales impregnados hay un aumento en la intensidad del pico correspondiente a la matriz de SiO_2 .

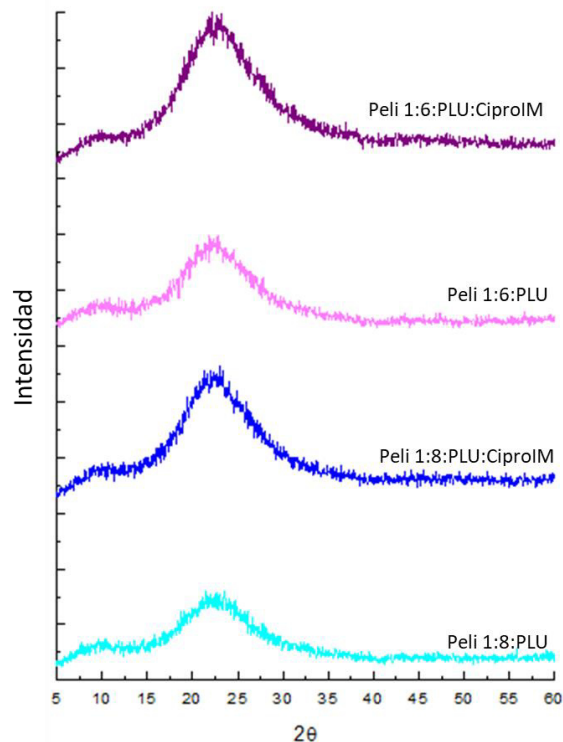


Figura 24. Comparación de patrones de difracción de rayos X de los materiales en forma de película con y sin impregnar ciprofloxacino

4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS)

4.2.4.1 Materiales sintetizados en forma de polvos y películas

En las imágenes MEB de polvos de SiO_2 de relación molar 1:6 con y sin pluronic (Figura 25) se observa una morfología similar con partículas que tienen la tendencia a formar agregados irregulares en el rango entre 0.3-0.6 μm . Sin embargo, en el caso de la síntesis con pluronic se observan partículas más homogéneas y ordenadas.

Mediante el análisis elemental por EDS se obtuvo la composición elemental de los materiales, los resultados indican en ambos materiales que solo

están presentes los elementos de la sílice (Si and O), confirmando la eliminación del pluronic durante la calcinación.

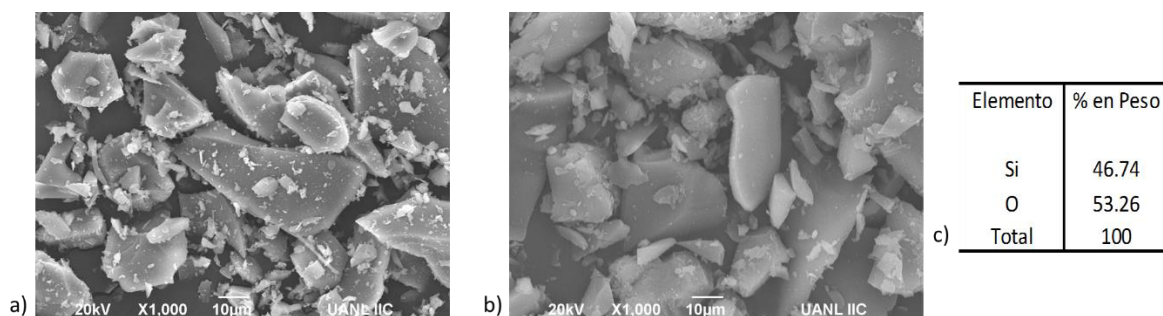


Figura 25. Imágenes MEB de polvos de SiO_2 con relación molar 1:6. a) sin pluronic b) con pluronic c) Análisis elemental por EDS

En las imágenes MEB de las películas de SiO_2 (Figura 26) se observa una morfología similar con placas irregulares en el rango entre 17-20 μm . En el caso de las películas sintetizadas sin pluronic se observan placas de menor tamaño, además de que se aprecia mayor número de capas con respecto a las películas sintetizadas con pluronic y concuerda con el número de deposiciones realizadas para alcanzar el peso de material establecido. Así mismo, se observa mayor homogeneidad en las películas sintetizadas con pluronic, ya que, durante la sinéresis, es decir, durante la expulsión de los solventes, las placas que se forman quedan con menos grietas.

El análisis elemental por EDS mostró la composición de los materiales, los resultados fueron los mismos que para el caso de los polvos (Figura 25, c) indicando que en las películas sólo están presentes los elementos de la sílice (Si and O).

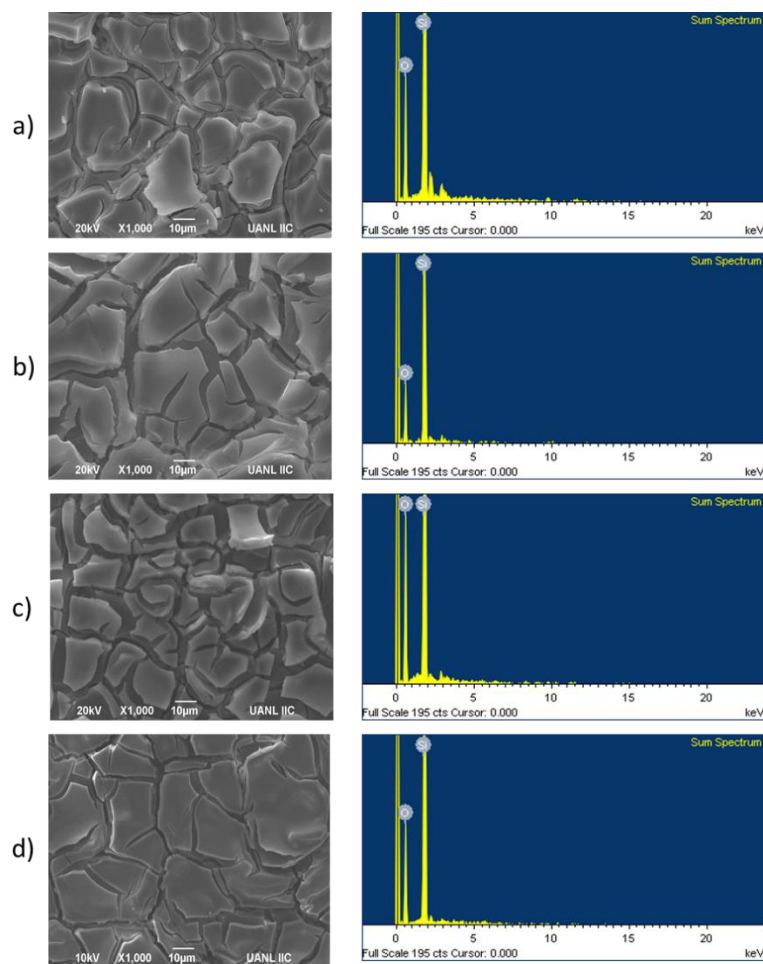


Figura 26. Imágenes MEB y espectro EDS de películas de SiO_2 : a) 1:6, b) 1:6:PLU, c) 1:8, d) 1:8:PLU

4.2.4.2 Materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis

En las imágenes MEB de los materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis (Figura 27) se observa una morfología similar tanto para la relación molar 1:6 como para la 1:8, mostrando partículas esféricas que tienen tendencia a formar agregados. En el caso de la relación 1:6 el diámetro de partícula varía de 200- 450 nm, y para la relación 1:8 el diámetro de partícula se encuentra ligeramente mayor, entre 200-500 nm, además, en la síntesis de relación 1:8 se observan partículas más homogéneas. El análisis por EDS mostró la composición elemental, los resultados indican que en ambos materiales están presentes los elementos de la sílice (Si and O) y adicionalmente se muestra la

línea de emisión del carbono, la cual se atribuye a la presencia de ciprofloxacino en la sílice, coincidiendo aproximadamente con el porcentaje de fármaco incorporado. Además, se detectó la presencia de cloro, el cual puede provenir de residuos de la síntesis.

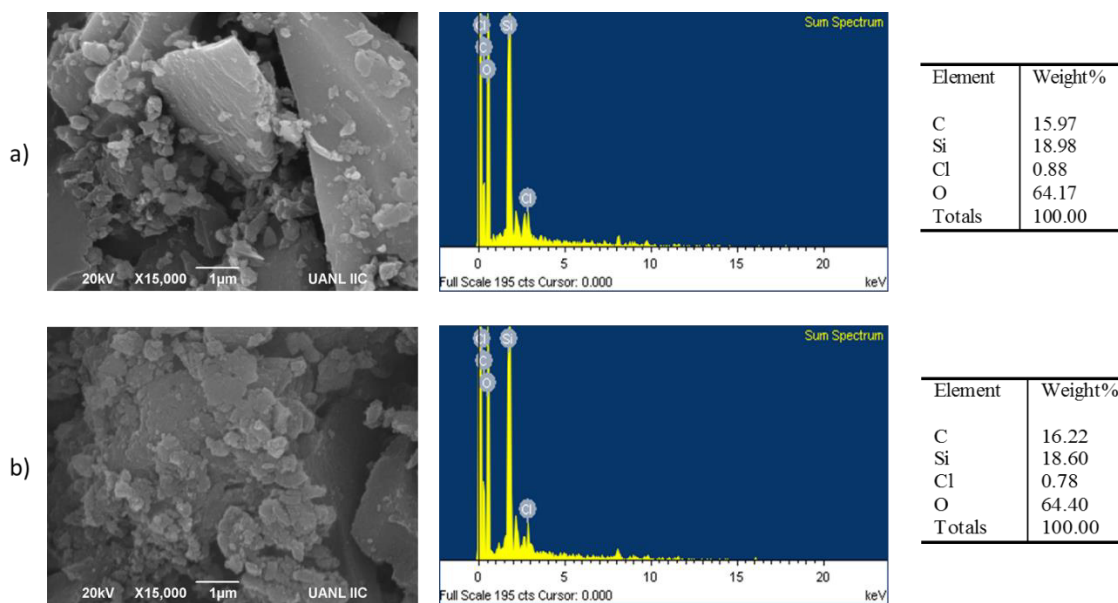


Figura 27. Imágenes MEB y espectro EDS de materiales en polvo con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis: a) 1:6:Cipro, b) 1:8:Cipro

4.2.4.3 Materiales impregnados con ciprofloxacino

En las imágenes MEB de polvos de SiO_2 de los materiales impregnados con ciprofloxacino (Figura 28) se observa una morfología similar entre ellos. Los materiales sintetizados con pluronic (c y d) muestran mayor homogeneidad observándose de forma esférica y presentan mayor diámetro de partícula.

En el caso de los materiales de relación 1:6 sin pluronic el diámetro de partícula varía de 150- 350 nm, y para los sintetizados con pluronic el diámetro de partícula se encuentra entre 250-350 nm. Los materiales de relación 1:8 sin pluronic presentan un diámetro de partícula que varía de 250- 550 nm, y para los sintetizados con pluronic el diámetro de partícula se encuentra entre 200-400 nm.

El análisis por EDS indicó que en la composición de los biomateriales están presentes los elementos de la sílice (Si and O) y el carbono en los biomateriales que contienen ciprofloxacino, considerando este resultado como la confirmación de la incorporación del fármaco, sin embargo, la línea de emisión del carbono no fue detectada en los materiales de relación 1:8 sintetizados con pluronic, probablemente debido a que su tamaño de partícula permite el acomodo del fármaco en interior del material, quedando menos disponible para su detección por esta técnica. El nitrógeno no pudo ser detectado por esta técnica, debido a que es un elemento muy liviano, además de su baja proporción en la molécula del fármaco y con respecto a la sílice.

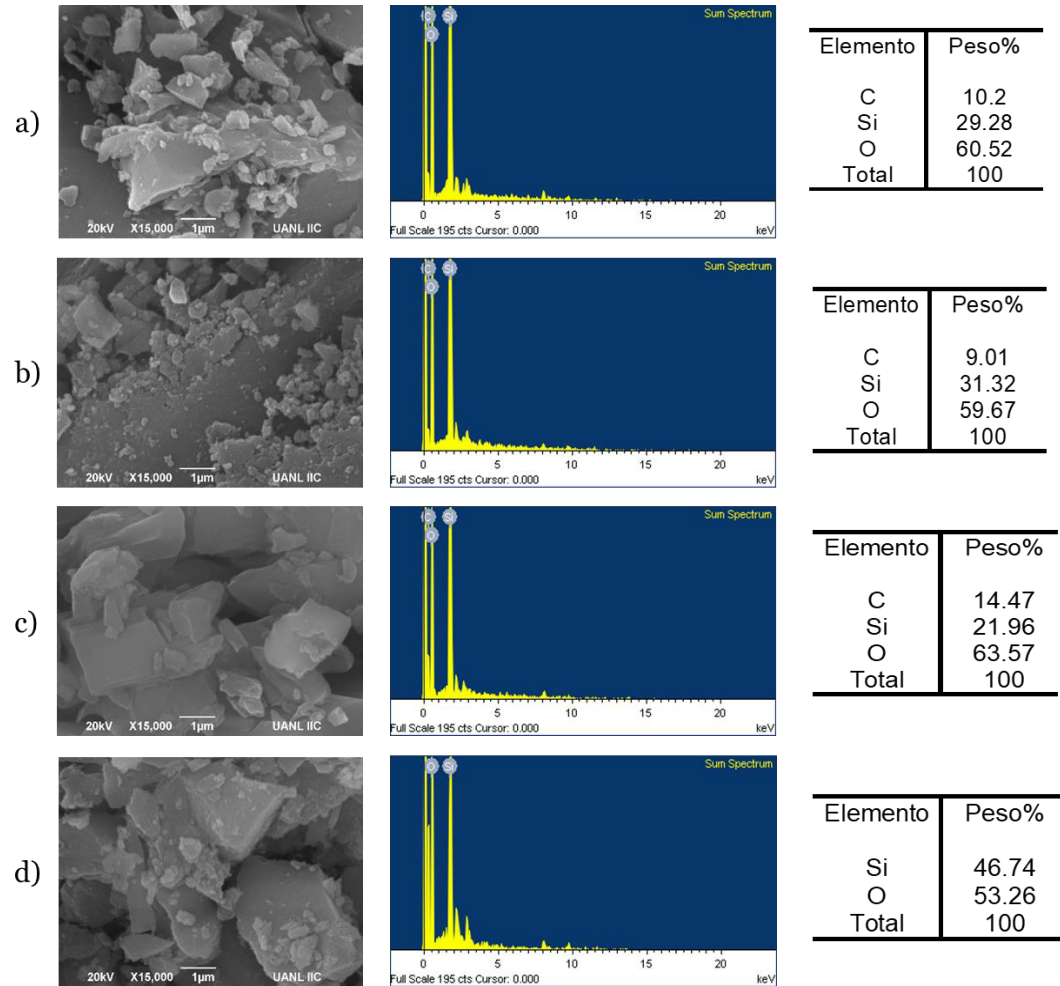


Figura 28. Imágenes MEB y espectro EDS de materiales impregnados con ciprofloxacino: a) 1:6:CiproIM, b) 1:6:PLU:CiproIM, c) 1:8:CiproIM, d) 1:8:PLU:CiproIM

4.2.5 Análisis textural: BET-BHJ

4.2.5.1 Materiales sintetizados en forma de polvos y películas

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales sintetizados en forma de polvo (Figura 29), corresponden a isothermas del tipo I para el materiales sintetizados sin pluronic de relación molar 1:6 y 1:8, y para los materiales con pluronic tanto de relación molar 1:6 como 1:8 se obtuvieron isothermas del tipo IV según la clasificación de la IUPAC.⁴³ Las isothermas del tipo I se caracterizan de ser sólidos microporosos y las de tipo IV es característica de sólidos mesoporosos, lo que indica que el pluronic favorece la formación de poros más grandes, derivados de los espacios que ocupa el tensoactivo durante la formación de las redes poliméricas y su posterior eliminación mediante la calcinación.

Además, en las gráficas de distribución de tamaño de poro, se observa mayor homogeneidad en los poros en los materiales sintetizados con pluronic, lo que confirma la función del tensoactivo como formador de plantillas para la generación de redes poliméricas ordenadas. Aunado a esto, la relación 1:6 propicia la obtención de poros con tamaño más homogéneo que los sintetizados con la relación 1:8, este comportamiento puede estar asociado a la velocidad de hidrólisis, la cual es menor cuando la proporción del agua, que actúa como nucleófilo en la reacción, es menor y por lo tanto tiende a formar redes menos ramificadas, favoreciendo la compactación entre las cadenas.

Se calcularon los valores de área superficial específica por el método BET (Brunauer-Emmet-Teller) y la porosidad por el método BJH (Barret-Joyner-Halenda). Los resultados (Tabla 11) mostraron que los biomateriales sintetizados con pluronic presentan mayor diámetro de poro y una mayor área superficial, con un incremento en el área de más del 500%.

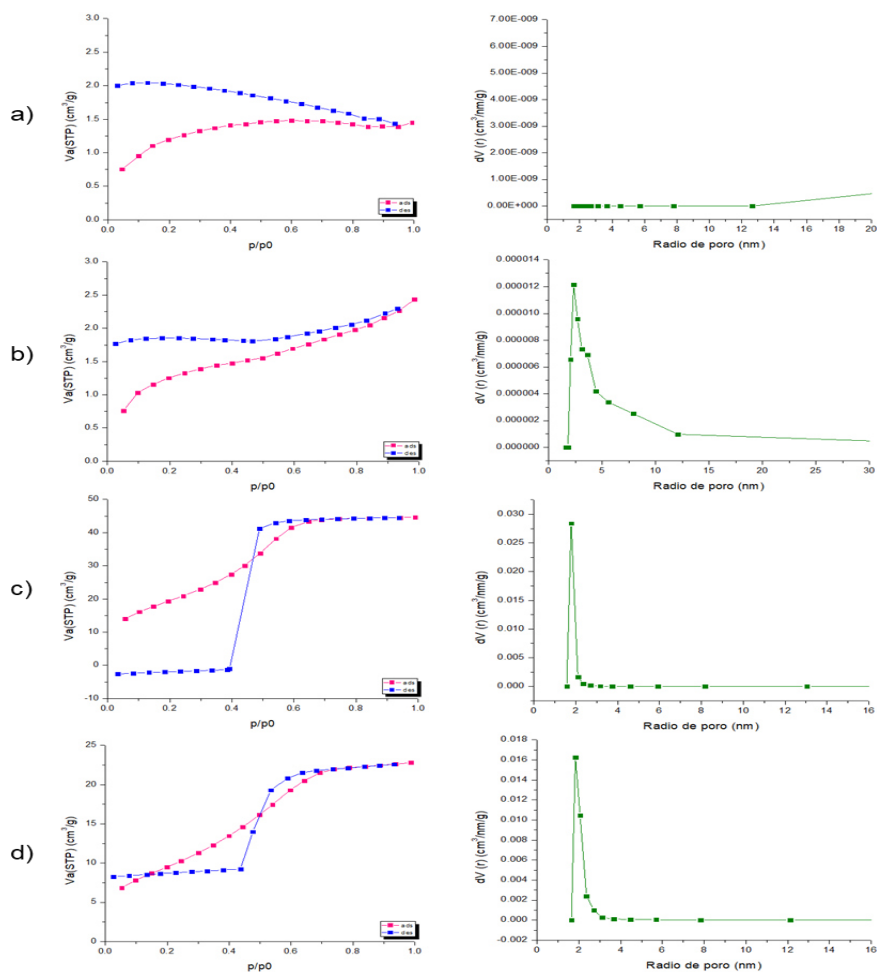


Figura 29 . Isotermas de adsorción de N_2 (izquierda) y gráficas de distribución de tamaño de poro (derecha) de materiales en polvo a) 1:6, b) 1:8, c) 1:6:PLU, d) 1:8:PLU

Tabla 11 . Características texturales obtenidas a partir de las isotermas de adsorción-desorción de materiales en polvo

	Área superficial SBet, m^2/g	Volumen total de poro (V_p), cc/g	Diámetro promedio de poro (d_p), nm
1:6	19.324	0.010	2.106
1:8	17.093	0.014	3.344
1:6:PLU	572.650	0.545	3.808
1:8:PLU	640.768	0.637	3.976

Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales sintetizados en forma de películas de relación molar 1:8 (Figura 30),

corresponden para las películas sin pluronic a isothermas del tipo III y para las películas sintetizadas con pluronic a isothermas del tipo IV según la clasificación de la IUPAC.⁴³ Las isothermas del tipo III son características de sólidos no porosos en los que la interacción adsorbente-adsorbato es débil y las de tipo IV presenta ciclo de histéresis y es característica de sólidos mesoporosos. Estas isothermas indican que la utilización de pluronic genera mayor porosidad ya que se adsorbe mayor cantidad de N₂.³⁸

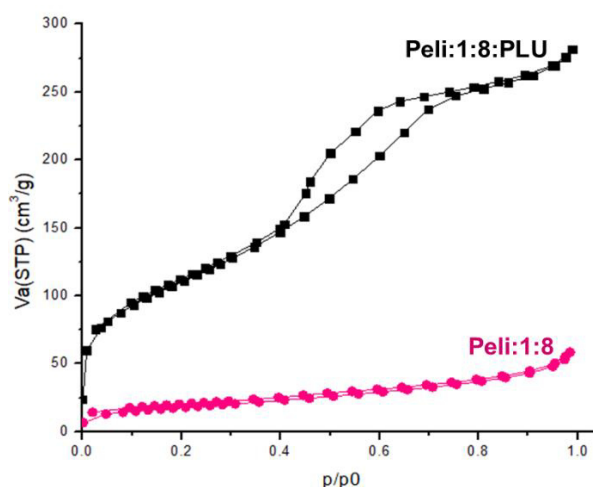


Figura 30. Isothermas de adsorción de N₂ de materiales sintetizados en forma de películas: 1:8 y 1:8:PLU

A partir de estas isothermas se calcularon los valores de área superficial específica por el método BET (Brunauer-Emmet-Teller) y la porosidad por el método BJH (Barret-Joyner-Halenda). Los valores muestran que los biomateriales sintetizados con pluronic presentan una mayor porosidad con diámetros de poro más pequeños y mayor área superficial (Tabla 12).

Tabla 12. Características texturales obtenidas a partir de las isothermas de adsorción-desorción de materiales en película

	Área superficial SBet, m ² /g	Volumen total de poro (Vp), cc/g	Diámetro promedio de poro (dp), nm
Peli 1:8	63.184	0.0901	5.7032
Peli 1:8:PLU	397.6	0.4353	4.3796

Además, en las gráficas de distribución de tamaño de poro (Figura 31) se observa una distribución de diámetro de poro más homogénea en las películas sintetizadas con pluronic. Los resultados obtenidos tanto en los polvos como en las películas sintetizadas confirman el efecto del pluronic sobre las características del material, es decir, favorecen el ordenamiento de los poros.

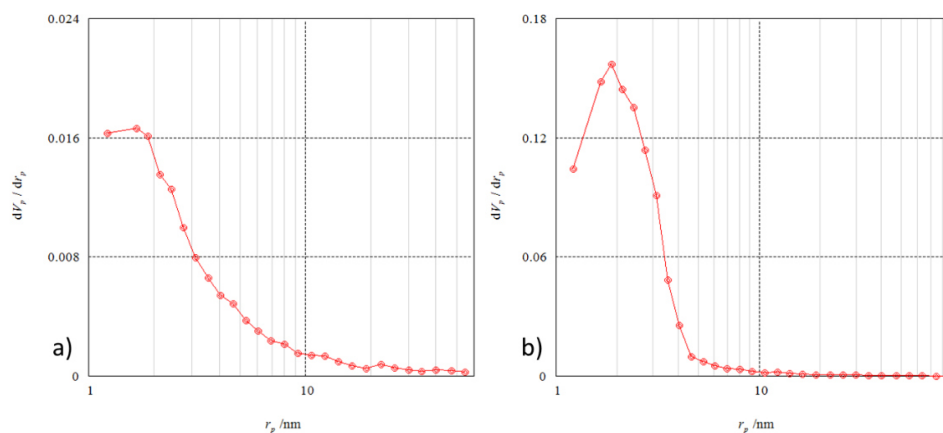


Figura 31. Distribución de tamaño de poro de materiales sintetizados en forma de películas: a)1:8, b)1:8:PLU

4.2.5.2 Materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis de relación molar 1:6 (Figura 32), corresponde a una isoterma del tipo I y según la clasificación de la IUPAC es característica de sólidos microporosos y en el caso de la síntesis de relación molar 1:8 presenta el ciclo de histéresis correspondiente a las isothermas del tipo IV, la cual es característica de sólidos mesoporosos.⁴³

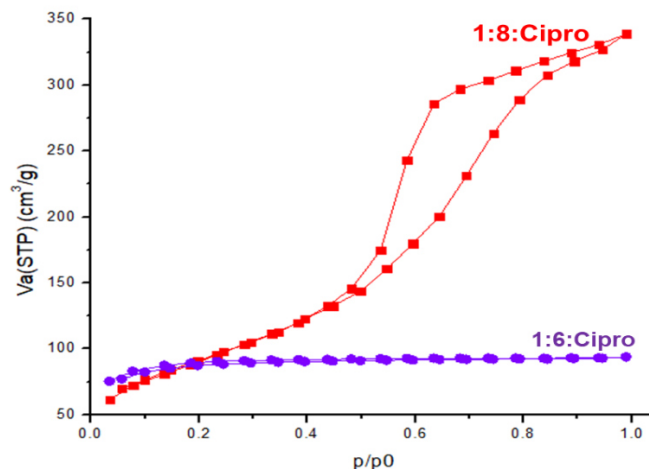


Figura 32 . Isotermas de adsorción de N_2 de materiales en polvo con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis

A partir de las isoterma se calcularon los valores de área superficial específica por el método BET (Brunauer-Emmet-Teller) y la porosidad por el método BJH (Barret-Joyner-Halenda) (Tabla 13). En un estudio realizado por López T. y col., donde sintetizan sílice con Ketorolaco incorporado durante la síntesis, se reporta que el comportamiento de los materiales al adsorber menor cantidad de N_2 está asociado a que el fármaco se encuentra llenando los poros y bloqueando el espacio disponible para la adsorción del gas y además relacionan que al utilizar una mayor relación de agua (1:8) se obtiene mayor porosidad, lo que en nuestro caso es semejante ya que en la síntesis de relación 1:8 se obtiene mayor porosidad y por lo tanto mayor área superficial y se observa mayor adsorción de N_2 comparado con la relación 1:6, donde la adsorción es baja y puede ser debido a que presenta poros de menor tamaño.³⁸

Tabla 13. Características texturales de materiales con ciprofloxacino incorporado durante la síntesis

	Área superficial SBet, m^2/g	Volumen total de poro (V_p), cc/g	Diámetro promedio de poro (d_p), nm
1:6:Cipro	270.853	0.1449	2.1402
1:8:Cipro	329.986	0.5241	6.3532

4.2.5.3 Materiales impregnados con ciprofloxacino

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales en polvo impregnados con ciprofloxacino (Figura 33), corresponden a isothermas del tipo I para el material de relación molar 1:6 sin pluronic y para los materiales con pluronic tanto de relación molar 1:6 como 1:8, corresponden a isothermas del tipo IV según la clasificación de la IUPAC.⁴³ Las isothermas del tipo I son características de sólidos microporosos y las de tipo IV es característica de sólidos mesoporosos.

Además, en las gráficas de distribución de tamaño de poro se observa un diámetro de poro más homogéneo en los materiales impregnados con ciprofloxacino que fueron sintetizados con pluronic.

Se calcularon los valores de área superficial específica por el método BET (Brunauer-Emmet-Teller) y la porosidad por el método BJH (Barret-Joyner-Halenda). Los resultados (Tabla 14) mostraron que los biomateriales sintetizados con pluronic presentan mayor diámetro de poro y una mayor área superficial, con un incremento en el área de más del 300%. Además, en estos mismos materiales se puede observar que la relación molar 1:6 proporciona mayor área superficial, volumen y diámetro de poro, que los materiales sintetizados con la relación molar 1:8, el incremento en el área superficial es del 5%.

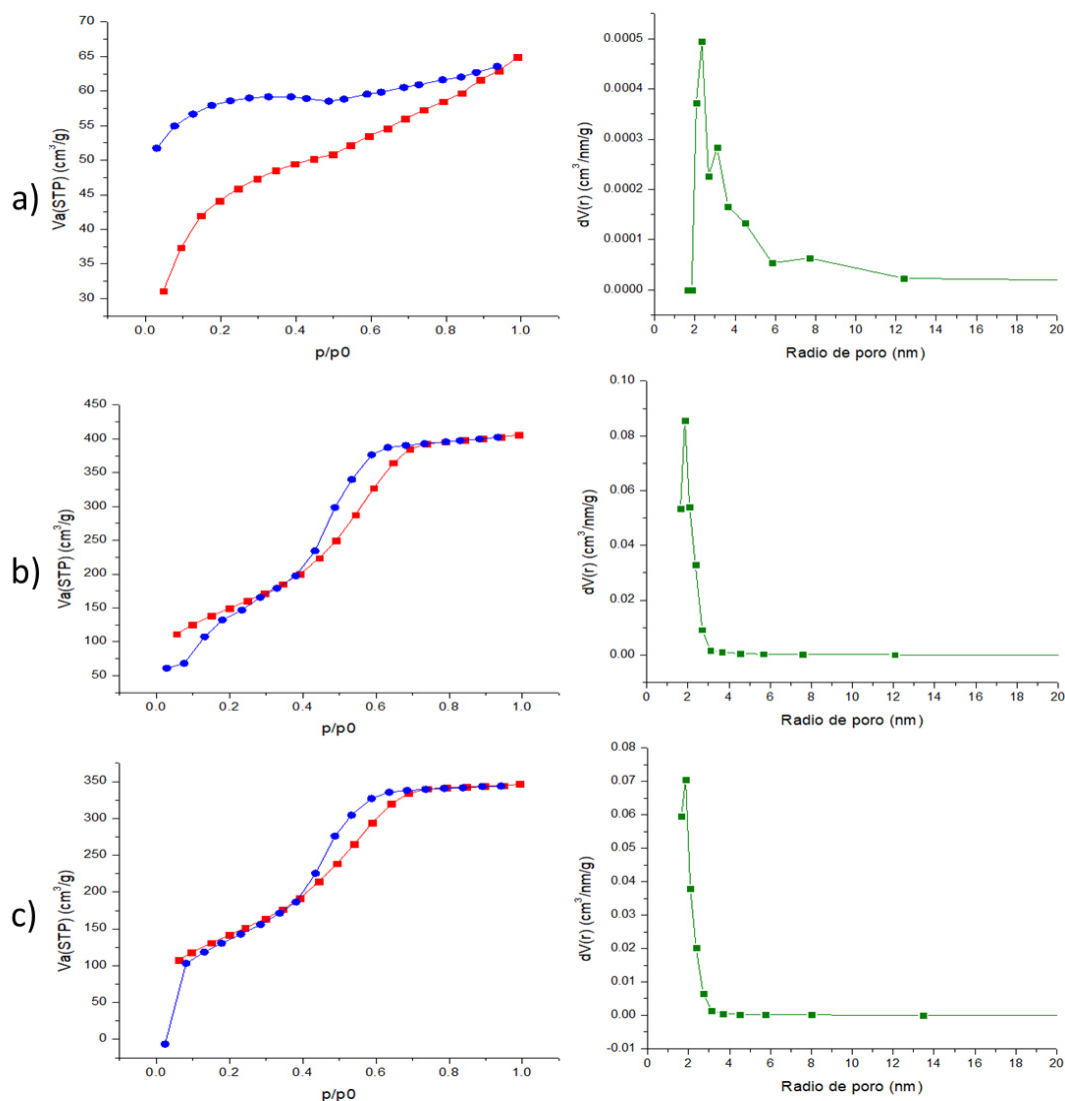


Figura 33 . Isotermas de adsorción de N_2 (izquierda) y gráficas de distribución de tamaño de poro (derecha) de materiales en polvo impregnados con ciprofloxacino:
a) 1:6:CiproIM, b) 1:6:PLU:CiproIM, c) 1:8:PLU:CiproIM

Tabla 14. Características texturales obtenidas a partir de las isotermas de adsorción-desorción de materiales impregnados con ciprofloxacino

	Área superficial SBet, m^2/g	Volumen total de poro (V_p), cc/g	Diámetro promedio de poro (d_p), nm
1:6:CiproIM	149.384	0.1004	2.6888
1:6:PLU:CiproIM	540.565	0.6277	4.6448
1:8:PLU:CiproIM	514.605	0.5361	4.1672

4.3 Identificación y cuantificación de ciprofloxacino

4.3.1 Cuantificación de ciprofloxacino por espectrofotometría UV-Vis

Se obtuvo el espectro de absorción UV-Vis de una solución de 10 µg/mL (10 ppm) (Figura 34, Tabla 15) encontrando que tiene un máximo de absorción a la longitud de onda de 277.0 nm.

Tabla 15. Barrido UV-Vis de ciprofloxacino

Rango de longitud de onda	Concentración	Longitud de onda máxima	Absorbancia
200- 400 nm	10 mg/L	277.0 nm	1.130

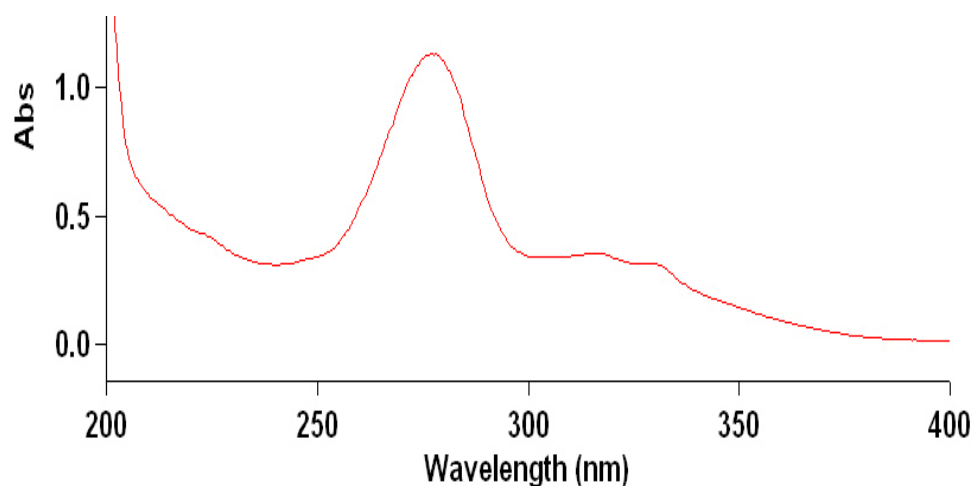


Figura 34. Barrido UV-Vis de ciprofloxacino

4.3.1.1 Curva de calibración por espectrometría UV-Vis

Se realizó una curva de calibración con seis estándares a partir de la solución stock (Tabla 16). Se llevaron a cabo las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 277.0 nm. En la curva de calibración para ciprofloxacino (Figura 35) se puede observar que el intervalo de concentraciones obtiene un coeficiente de correlación lineal de 0.9999, siendo aceptable.

Tabla 16. Estándares de la curva de calibración de ciprofloxacino

Estándar	Concentración (µg/mL)
1	0.5
2	1
3	5
4	10
5	15
6	20

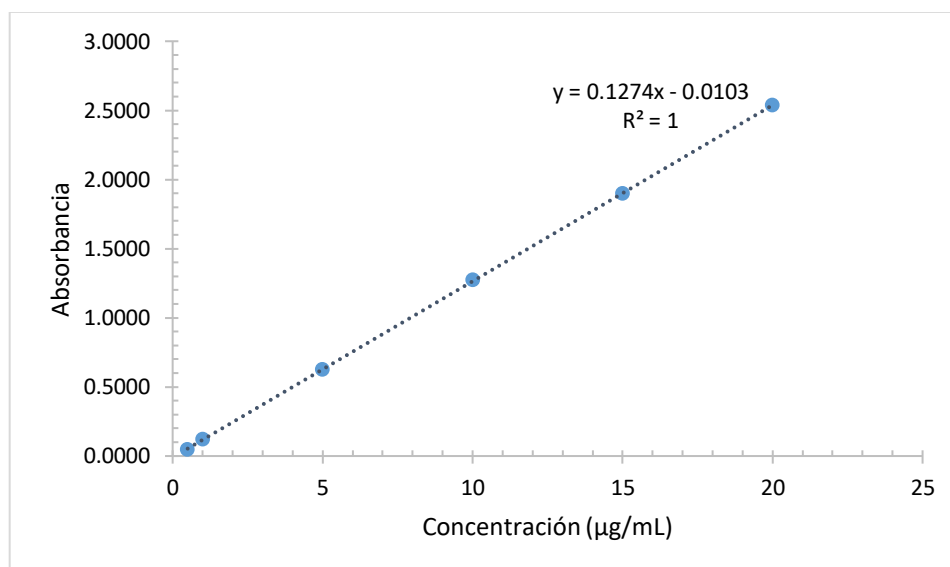


Figura 35. Curva de calibración para ciprofloxacino por espectrometría UV, obtenida por la preparación de seis estándares

4.3.2 Cuantificación de ciprofloxacino por HPLC-UV

Para conocer la longitud de onda de máxima absorción de ciprofloxacino se registró el espectro de absorción UV-Vis en un espectrofotómetro (Varian Cary 50), encontrando que tiene un máximo de absorción a la longitud de onda de 278 nm. El volumen de inyección fue de 10 µL, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min

y la señal de ciprofloxacino en el cromatograma se presentó con un tiempo de retención de 2.57 minutos (Figura 36).

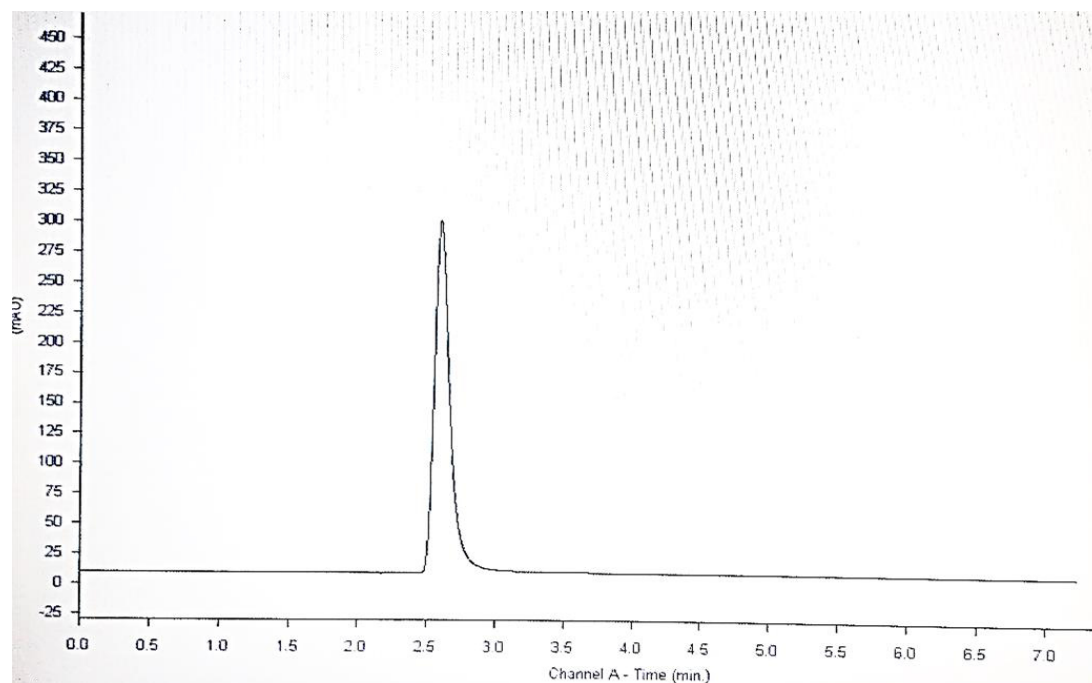


Figura 36. Cromatograma de ciprofloxacino (estándar 10 ppm)

4.3.2.1 Validación del método analítico

La validación del método analítico se realizó por triplicado, para ello se trabajó con ocho estándares de ciprofloxacino de 0.3, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) y se obtuvo el valor de área bajo la curva (AUC) por HPLC (Tabla 17).

Tabla 17. Datos obtenidos por triplicado (Validación del método por HPLC/UV)

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Promedio
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Área	Área	Área
0.3	23950	26868	29381	26733
0.5	38558	40797	44055	41137
1	77489	77251	81072	78604
5	369166	390087	392422	383892
10	753523	752806	764906	757078
15	1151647	1141408	1124763	1139273
20	1531014	1526171	1510691	1522625
30	2334333	2305019	2229936	2289763

Con esos datos se obtuvo la curva de calibración (Figura 37) y se obtuvieron los parámetros generales de la validación del método (Tabla 18).

Tabla 18. Parámetros generales de validación del método para ciprofloxacino por HPLC/UV

Datos estadísticos del método	
Ecuación de la recta	$y = 76125.17x + 1508.14$
Coeficiente de correlación (r)	0.999991
Coeficiente de determinación (r^2)	0.999982
Error relativo de la regresión	0.47%
Límite de detección (LD)	0.50 $\mu\text{g/mL}$
Límite de cuantificación (LC)	1.52 $\mu\text{g/mL}$

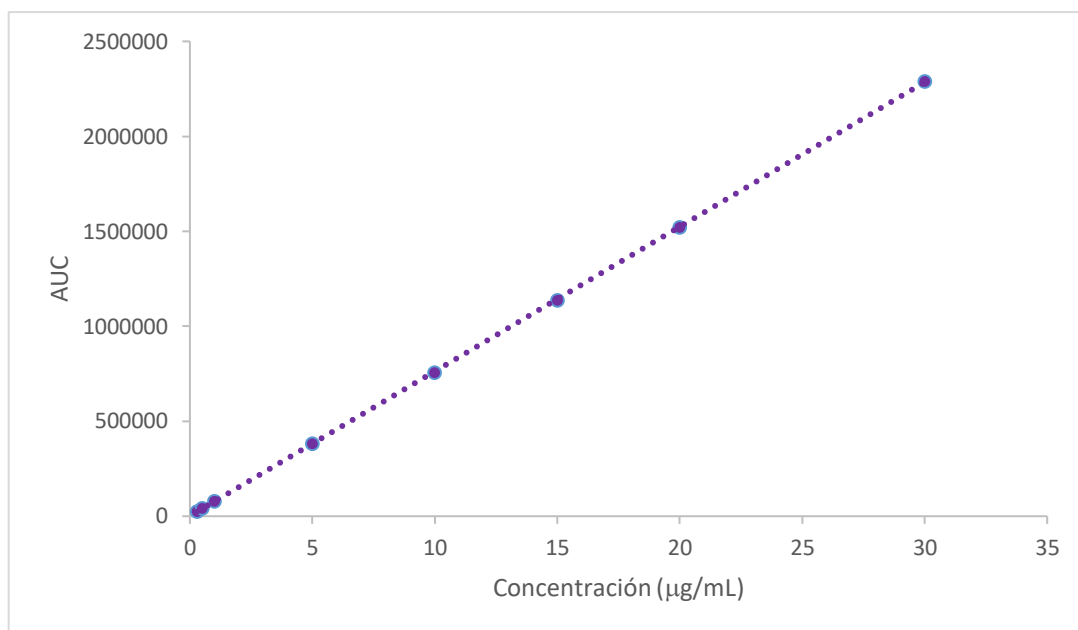


Figura 37. Curva de calibración de ciprofloxacino en HPLC/UV

4.3.3 Pruebas de extracción

Los resultados (Tabla 19) muestran el porcentaje de fármaco, tomando en cuenta que el 100% corresponde al ciprofloxacino añadido al 20% en peso del material. En la condición de extracción (solución amortiguadora de fosfatos pH 7.1, 100 rpm, 37°), la máxima incorporación del fármaco se alcanzó con los biomateriales que fueron sintetizados con ciprofloxacino durante la síntesis, entre ellos el de mayor extracción fue Peli:1:8:Cipro con 74.75%. Esto puede deberse a que durante la síntesis una mayor cantidad de fármaco quede ocluida dentro de la matriz, además del fármaco que es adsorbido en la superficie de las partículas.³⁸

En el caso de los materiales que incorporan ciprofloxacino por impregnación, los polvos sintetizados con pluronic en cualquiera de las dos relaciones molares, 1:8:PLU:CiproIM y 1:6:PLU:CiproIM incorporaron mayor porcentaje de fármaco que su contraparte sintetizada sin tensoactivo, con 15.44% y 11.97% respectivamente. Este comportamiento se presentó tanto en

polvo como en películas, presentando mayor incorporación cuando se utiliza el tensoactivo. Debido a estos resultados y a las características texturales de los materiales, se seleccionaron los materiales sintetizados con pluronic para los estudios de liberación *in vitro* en medio líquido.

Tabla 19 . Resultados de extracción de los biomateriales sintetizados vía sol-gel

Relación TEOS/H ₂ O	Forma de incorporación del fármaco	Material	% Extracción
1:6	Impregnación	Peli:1:6:CiproIM	4.58
		1:6:CiproIM	7.18
		Peli:1:6:PLU:CiproIM	8.74
		1:6:PLU:CiproIM	11.07
	Durante la síntesis	Peli:1:6:Cipro	27.83
		1:6:Cipro	47.39
1:8	Impregnación	Peli:1:8:CiproIM	3.35
		1:8:CiproIM	14.05
		Peli:1:8:PLU:CiproIM	3.43
		1:8:PLU:CiproIM	15.44
	Durante la síntesis	Peli:1:8:Cipro	74.75
		1:8:Cipro	43.26

4.3.4 Evaluación de la liberación de ciprofloxacino

4.3.4.1 Evaluación de la cinética liberación *in vitro* mediante adaptación del método de perfil de disolución

Las pruebas de liberación *in vitro* en medio líquido se realizaron por triplicado con los polvos y películas sintetizados con pluronic de relación TEOS/H₂O 1:6 y 1:8 que incorporan ciprofloxacino por impregnación. Los resultados indican que los polvos impregnados sintetizados con pluronic presentan aproximadamente el doble de liberación del fármaco, comparados con los obtenidos en forma de película.

El biomaterial en polvo 1:6:PLU:CiproIM fue el que alcanzó el mayor porcentaje de liberación de ciprofloxacino con un 62.6% seguido del 1:8:PLU:CiproIM con 60.16%, posteriormente Peli:1:8:PLU:CiproIM con un 36.06% y finalmente Peli1:6:PLU:CiproIM con un 25.28% (Figura 38). Este comportamiento concuerda con las características texturales de los biomateriales, ya que la mayor liberación se presenta en los biomateriales con mayor tamaño de partícula y mayor área superficial. Sin embargo, en la prueba de extracción, el porcentaje de incorporación de ciprofloxacino en el material 1:6:PLU:CiproIM fue menor que el porcentaje en el material 1:8:PLU:CiproIM, esto puede deberse a que presenta un tamaño de poro mayor, por lo que no se puede contener al fármaco y por esta misma razón se libera una mayor cantidad.

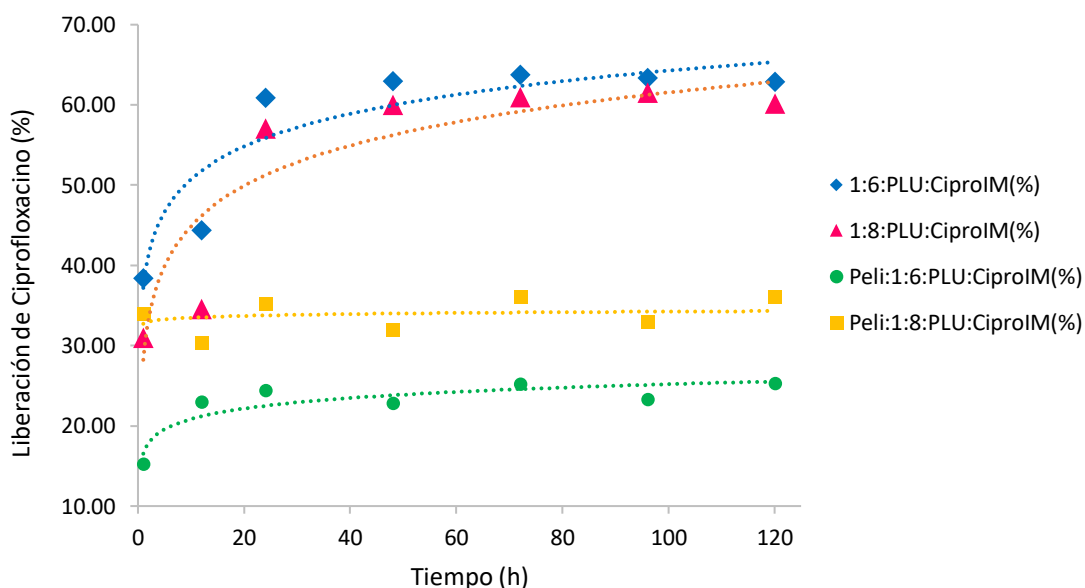


Figura 38. Cinética de liberación de ciprofloxacino.

Para comparar el comportamiento de liberación en todos los materiales sintetizados, se realizaron pruebas de liberación *in vitro* en medio líquido por triplicado. Se realizó bajo las mismas condiciones, un sistema estático, a temperatura ambiente y utilizando como medio de liberación una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.1; se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos y en este caso se realizó reposición del medio. El porcentaje de liberación se obtuvo de acuerdo con la cantidad incorporada de ciprofloxacino en cada material.

Los resultados indican que la liberación máxima se alcanza a las 72 h en todos los biomateriales. Con respecto al porcentaje de fármaco liberado, los materiales en polvo sintetizados con menor proporción de agua (TEOS/Agua 1:6) presentaron un mayor porcentaje de liberación del fármaco.

El biomaterial en polvo 1:6:CiproIM fue el que alcanzó el mayor porcentaje de liberación de ciprofloxacino con un 81.1% seguido del 1:6:Cipro con 79.6% (Figura 39). Sin embargo, el polvo 1:6:CiproIM, no fue de los que presentó mayor incorporación de ciprofloxacino, esto puede ser debido a que en sus características texturales presenta una menor área superficial y un diámetro de poro pequeño, lo que indica que incorpora menos porque no hay espacio para contener al fármaco, quedando en la superficie del material y por esta razón se libera con mayor facilidad.

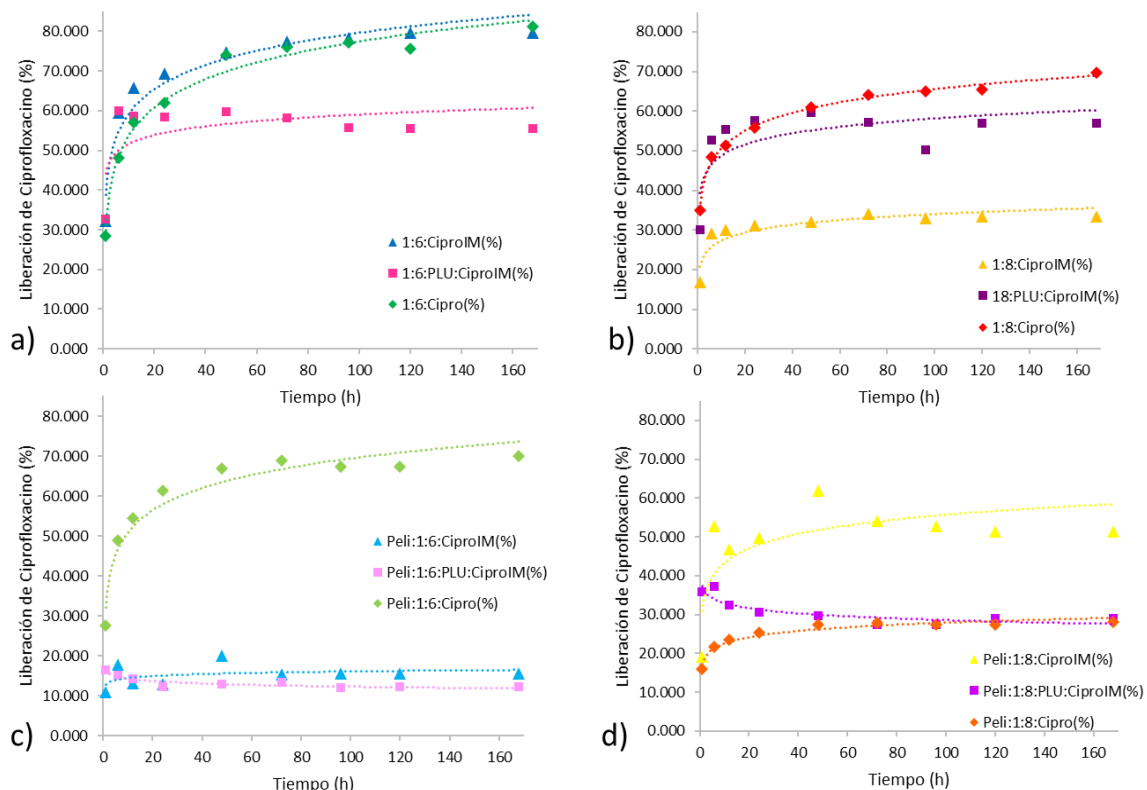


Figura 39 . Comparación de las cinéticas de liberación de ciprofloxacino. Materiales relación molar: a)polvos 1:6, b)polvos 1:8, c)películas 1:6, d)películas 1:8

4.3.4.2 Evaluación de la liberación mediante la determinación del efecto bactericida

Las alícuotas tomadas a partir del estudio de liberación *in vitro* en solución de ciprofloxacino se probaron por el método de difusión en disco sobre cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se observó mayor inhibición a partir las placas con las alícuotas de las 48 h (Figura 340). En los resultados (Figura 41) se observa que los materiales en forma de película no presentaron inhibición, esto puede deberse a que las concentraciones de ciprofloxacino que se liberaron de los materiales Peli:1:6:PLU:CiproIM y Peli:1:8:PLU:CiproIM fueron muy pequeñas y las

concentraciones que presentaron mayor inhibición fueron los polvos 1:6:PLU:CiproIM y 1:8:PLU:CiproIM.

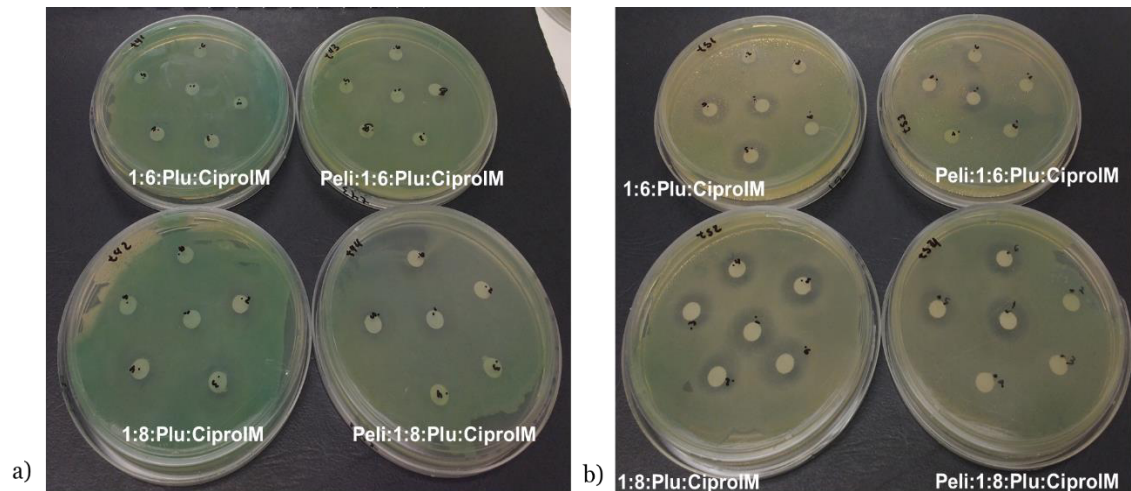


Figura 40. Inhibición de crecimiento bacteriano por el ciprofloxacino a los tiempos: a)48 h, b)72 h

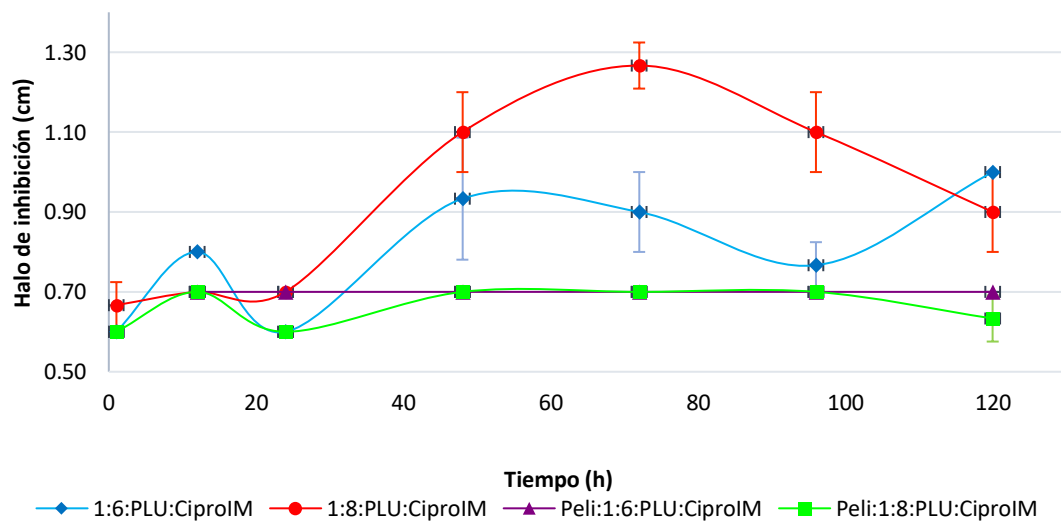


Figura 41. Cinética de la liberación de ciprofloxacino mediante el método de difusión en disco

4.4 Método alternativo de síntesis de nanopartículas de sílice y modificación de sus propiedades por funcionalización.

4.4.1 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílice mesoporosa por el método de Arriagada y col.

Se obtuvieron cuatro tipos de nanopartículas: sin y con tensoactivo sin funcionalizar, y sin y con tensoactivo funcionalizadas, y se calculó la cantidad de nanopartículas obtenida en cada síntesis (Tabla 20). Las nanopartículas funcionalizadas obtuvieron mayor peso debido a la presencia del agente funcionalizante.

Tabla 20 . Cantidad de nanopartículas obtenida durante la síntesis

Tipo de Nanopartícula	Cantidad (mg)
Sin tensoactivo sin funcionalizar (NPS)	245
Con tensoactivo sin funcionalizar (NPC)	230
Sin tensoactivo funcionalizada (ANPS)	360
Con tensoactivo funcionalizada (ANPC)	288

4.5 Pruebas de adsorción de ciprofloxacino en nanopartículas de sílice mesoporosa sintetizada por el método de Arriagada y col.

4.5.1 Incorporación de ciprofloxacino en nanopartículas

La determinación de las nanopartículas que adsorben mayor cantidad de ciprofloxacino se llevó a cabo como se indicó en metodología mediante la cuantificación de fármaco residual y se realizaron los ajustes para expresarse en mg de fármaco unido a 100 mg de nanopartículas. Las nanopartículas sintetizadas sin funcionalizar obtuvieron mayor cantidad de ciprofloxacino unida a estas comparado con las nanopartículas funcionalizadas con grupos amino, y además se observó que la utilización de tensoactivo no potencia la unión del

fármaco, ya que las nanopartículas sintetizadas sin el tensoactivo adsorbieron mayor cantidad de fármaco (Tabla 21).

Las nanopartículas sintetizadas sin tensoactivo y sin funcionalizar incorporaron la mayor cantidad de ciprofloxacino (6.06 mg de ciprofloxacino en 100 mg de nanopartículas). Esto puede deberse a que las nanopartículas en la superficie presentan grupos hidroxilo libres los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con la estructura del ciprofloxacino. Con el uso de tensoactivo se esperaba incrementar la formación de poros y por lo tanto la incorporación del fármaco, sin embargo, es necesario asegurar la eliminación del tensoactivo mediante la técnica de extracción.

Tabla 21 . Incorporación de ciprofloxacino en la nanopartícula

Nanopartícula (NP)	Cantidad de ciprofloxacino incorporada (mg/100 mg NP)
NPS	6.06
NPC	2.97
ANPS	1.63
ANPC	1.59

4.5.2 Cuantificación de ciprofloxacino para las nanopartículas

Se realizó la curva de calibración con seis estándares a partir de la solución stock (Tabla 22). Se llevaron a cabo las mediciones de área bajo la curva a una longitud de onda de 279.0 nm, con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min de fase móvil compuesta por ácido acético 2%: acetonitrilo (86:14), obteniendo un tiempo de retención de 2.57 min. En la curva de calibración para ciprofloxacino (Figura 42) se puede observar que el intervalo de concentraciones obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.9987, siendo aceptable.

Tabla 22. Estándares de la curva de calibración de ciprofloxacino

Estándar	Concentración (µg/mL)
1	15
2	50
3	100
4	300
5	600
6	720

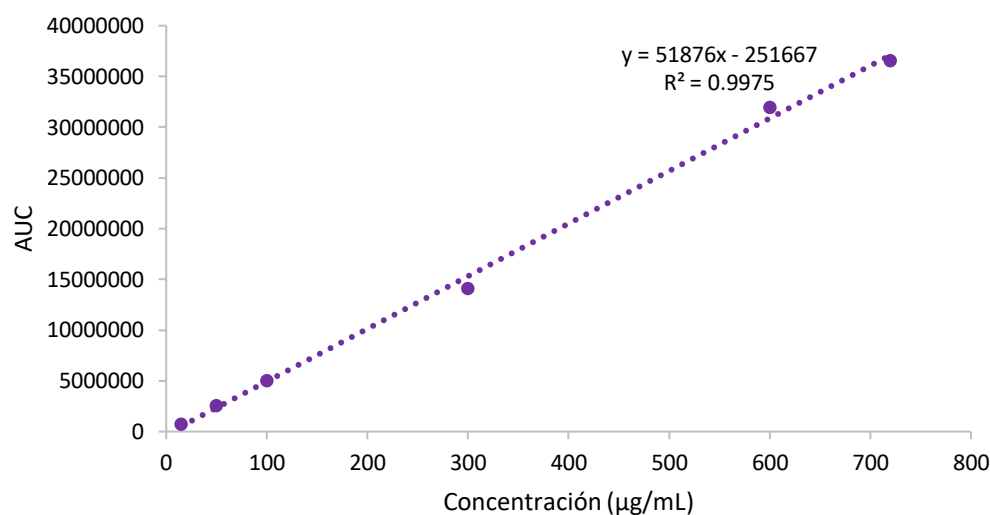


Figura 42 . Curva de calibración para ciprofloxacino por HPLC/UV, obtenida por la preparación de seis estándares

4.6 Caracterización de nanopartículas de sílice sintetizadas por el método de Arriagada y col.

4.6.1 Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta

Para la medición del tamaño medio de partícula (Tabla 23) las muestras se diluyeron con etanol. Se observaron cambios de tamaño entre las diferentes síntesis y tras la adición de ciprofloxacino, la funcionalización y la utilización del

tensoactivo CTAB aumentaron el tamaño medio de la partícula. Los índices de polidispersidad (PDI) oscilaron entre 0.188 y 0.551 revelando que el tamaño de la partícula presenta una distribución polidispersa moderada excepto para las nanopartículas ANPS ya que un $PDI > 0.4$ indica una polidispersidad amplia.^{44,45}

Tabla 23. Tamaño promedio de nanopartícula

Nanopartícula	Tamaño (nm)	PDI
NPS	88.21 ± 30.55	0.188 ± 0.017
NPC	129.3 ± 44.62	0.143 ± 0.001
ANPS	455.2 ± 67.04	0.551 ± 0.211
ANPC	485.6 ± 99.55	0.380 ± 0.112
NPS-CFX	107.2 ± 33.54	0.299 ± 0.071

Se realizó la determinación del potencial zeta (Tabla 24) para las NPS y NPS-CFX dispersadas en agua y en soluciones acuosas a pH 3, 7.4 y 8. En las NPS dispersas en agua y en solución acuosa a pH 7.4 se obtiene un valor de potencial Z más negativo, estos resultados se deben a la ionización de los grupos silanol en la superficie de la sílice. Branco de Barros y col., reportan un valor de potencial zeta de -28.5 ± 2 mV para nanopartículas sintetizadas de manera similar dispersas en una solución acuosa a pH 7.⁴⁶

La presencia de ciprofloxacino en las nanopartículas dispersadas a pH del agua y a pH de 7.4, no presenta un efecto relevante sobre el potencial superficial ya que no cambia el valor negativo, debido a que las aportaciones del fármaco son mínimas al presentar una porción catiónica NH_2^+ y una aniónica COO^- . Por otra parte, a pH 3, el ciprofloxacino se encuentra ionizado debido a que el ácido carboxílico y la amina de la piperazina están en su forma ácida con una estructura catiónica, cambiando el valor de potencial de superficie a positivo. Además, a pH 8, el ciprofloxacino se encuentra ionizado ya que tanto el ácido carboxílico como

la amina de la piperazina están en su forma básica cambiando el potencial de superficie de la nanopartícula.⁴⁷

Llinás M. y col., mencionan que, si las nanopartículas obtienen un elevado valor absoluto de potencial zeta, estas tenderán a repelerse entre sí y en cambio si presentan bajos valores de potencial zeta las nanopartículas acabarán floculando, ya que no existe ninguna fuerza que lo impida. Los resultados que se obtuvieron de potencial zeta se encuentran dentro del rango de +30 a -30 mV, estos valores corresponden a suspensiones inestables.⁵

Tabla 24. Valores de potencial Zeta de las nanopartículas dispersas en soluciones acuosas a diferentes pH.

Nanopartícula	Potencial Zeta (mV)			
	Agua	pH 3.0	pH 7.4	pH 8.0
NPS	-22.3	-0.614	-25.8	-21.0
NPS-CFX	-31.8	5.29	-24.9	-10.0

4.6.2 Determinación del mecanismo de adsorción de ciprofloxacino en las nanopartículas mediante modelos isotérmicos

Los modelos isotérmicos como el de Langmuir, Freundlich y Temkin se utilizan para describir el equilibrio de adsorción y proporcionan un enfoque para elucidar el mecanismo de adsorción. El modelo de Langmuir supone la adsorción en monocapa, por otro lado, el modelo de Freundlich describe la adsorción en multicapa y el modelo de Temkin considera los efectos de algunas interacciones indirectas adsorbato-adsorbente.¹⁰

Para determinar la capacidad de adsorción de las nanopartículas y describir la relación entre el adsorbente y el adsorbato, se analizaron los datos de acuerdo con las formas linealizadas de isotermas de adsorción de Langmuir, Freundlich y Temkin, que corresponden a las siguientes ecuaciones:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_m b} + \frac{1}{Q_m} C_e \quad (\text{Ec.7})$$

$$\log(q_e) = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad (\text{Ec.8})$$

$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \quad (\text{Ec.9})$$

Los datos se ajustaron a los modelos de Langmuir, Freundlich y Temkin (Figura 43) se obtuvieron los siguientes coeficientes de determinación: R^2 Freundlich = 0.9484; R^2 Langmuir = 0.7706; R^2 Temkin = 0.833. La mayor correlación de los datos fue con el modelo de Freundlich y sugiere que la adsorción de ciprofloxacino sobre la superficie de las nanopartículas sigue una adsorción multicapa.

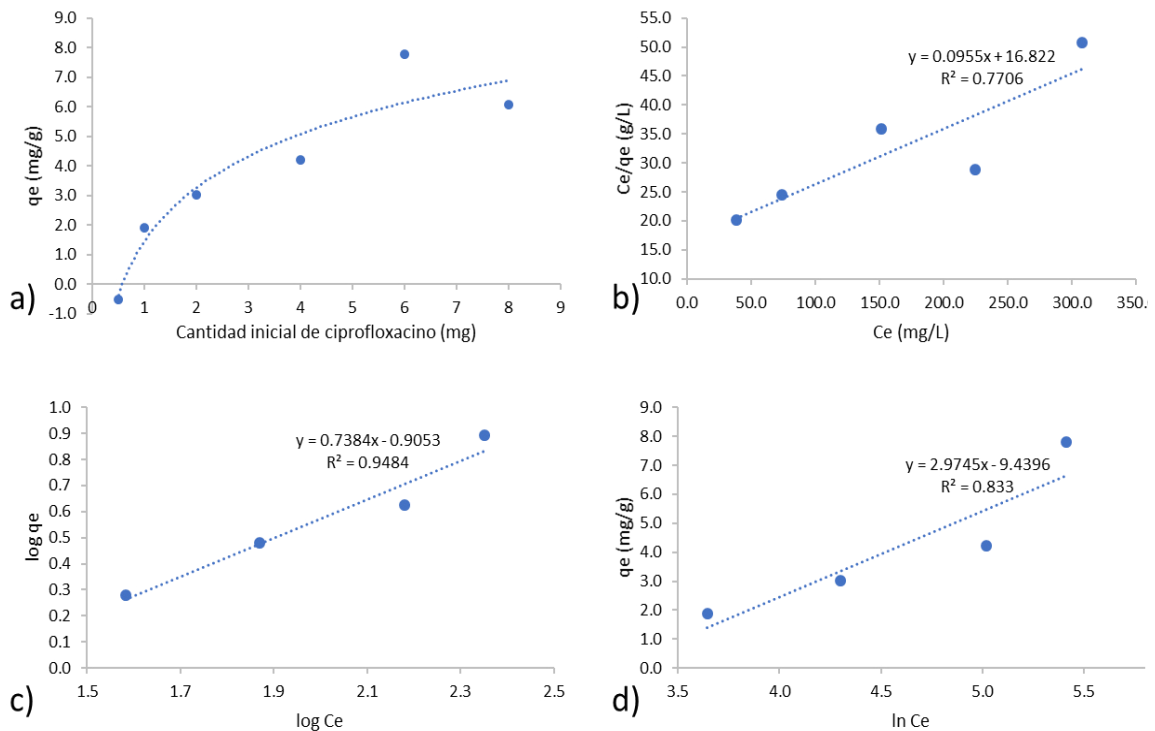


Figura 43. Adsorción de ciprofloxacino en nanopartículas de sílice. a) Cantidad adsorbida de ciprofloxacino. Ajuste de los datos utilizando las isothermas: b) Langmuir, c) Freundlich y d) Temkin

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Por medio de la técnica sol-gel fue posible desarrollar materiales a base de SiO_2 en forma de polvos y películas capaces de incorporar y liberar el fármaco ciprofloxacino con potencial aplicación en el desarrollo de implantes para el tratamiento o profilaxis de infecciones osteoarticulares.

En el proceso sol-gel, la proporción de precursores y la cantidad de solvente afecta las etapas de hidrólisis y la velocidad de gelificación. El comportamiento presentado muestra que al incrementar la cantidad de etanol el tiempo de gelación aumenta; la relación molar TEOS/Etanol 1:10 permite que el sol permanezca estable el tiempo necesario para llevar a cabo al menos 13 deposiciones.

La relación molar TEOS/ H_2O 1:8 tienen un tiempo de gelación menor y permite depositar mayor cantidad de material (30%) comparado con las síntesis de relación molar 1:6. Las síntesis con pluronic propician que con menor número de capas se deposite mayor cantidad de material.

El análisis térmico demostró que la temperatura de calcinación de 400°C con una rampa de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ permite la eliminación del pluronic.

La utilización del pluronic como plantilla permite la obtención de materiales con mayor homogeneidad y cristalinidad, al presentar un tamaño de partícula

más homogéneo y además en sus características texturales presentan mayor área superficial.

Se demostró por difracción de rayos X que la matriz de los materiales sintetizados por la técnica sol-gel es amorfa.

Mediante técnicas de espectroscopia infrarroja y difracción de rayos X se confirmó la presencia de ciprofloxacino incorporado a la matriz de SiO_2 por ambas técnicas: impregnación o durante la síntesis.

La incorporación de ciprofloxacino durante la síntesis permite que haya una mayor cantidad de fármaco adsorbido en la matriz, debido a que el fármaco queda ocluido en el interior, comparado con la adsorción por la técnica de impregnación.

El material en polvo de relación molar TEOS/ H_2O 1:6 que incorpora ciprofloxacino durante la síntesis (1:6:Cipro) presenta las dos propiedades requeridas, altos porcentajes de incorporación y de liberación en un tiempo mayor de 72 h, convirtiéndolo en el principal candidato para una formulación de liberación prolongada.

En la incorporación del fármaco por impregnación, el mejor material fue el polvo sintetizado con pluronic de relación molar TEOS/ H_2O 1:8 (1:8:PLU:CiproIM), ya que entre ellos es el que presenta mayores porcentajes de incorporación y liberación en un tiempo mayor de 72 h.

Además, las síntesis de relación molar TEOS/ H_2O 1:8 permiten una mayor adsorción del fármaco, ya que presentan mayor área superficial y mayor tamaño de poro, comparado con las características texturales de las síntesis de relación molar 1:6.

La inhibición de crecimiento bacteriano observada en el método por difusión en placa demuestra que la cantidad de ciprofloxacino liberada es capaz de inhibir al microorganismo, concordando con los resultados obtenidos por el método de liberación y confirmando la conservación de la actividad del ciprofloxacino en el biomaterial.

La síntesis alternativa de nanopartículas de sílice por el método de Arriagada y col., permite obtener nanopartículas de menor tamaño y con mayor uniformidad que el método clásico de sol-gel, las cuales pueden contener hasta el 6% de ciprofloxacino. Sin embargo, es necesario estudiar las características de liberación del fármaco para considerar su potencial aplicación en el desarrollo de implantes.

La funcionalización de la superficie de las nanopartículas con grupos amino proporcionados por el APTES, no favorece la adsorción de ciprofloxacino, lo cual puede deberse a que la carga del grupo amino y la del grupo piperazina en la estructura del fármaco se encuentran ionizadas en forma catiónica en las condiciones de adsorción y por lo tanto las moléculas se repelen.

El desarrollo de estos materiales cerámicos con propiedades que permiten la liberación prolongada del principio activo, contribuye al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de liberación con potencial para constituir un implante, contribuyendo a reducir los efectos secundarios sistémicos, al ser una forma farmacéutica con liberación localizada y los problemas asociados al incumplimiento de la terapia por parte del paciente, como la resistencia en el caso de los antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Piña, C. M. Los biomateriales y sus aplicaciones. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 55-58 (2007).
2. Duffo, G. *Biomateriales. Materiales y materias primas*. (Ministerio de Educación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica, 2011).
3. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. & Lemons, J. E. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. (1996).
4. Catauro, M. & Bollino, F. Release kinetics of anti-inflammatory drug, and characterization and bioactivity of SiO₂+PCL hybrid material synthesized by sol-gel processing. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* 12, 218-227 (2014).
5. Llinàs, M. C. & Sánchez García, D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad* LXXI, 20-31 (2014).
6. Vallet Regí, M. & Doadrio Villarejo, A. L. *Monografía XIX. Liberación en matrices de fármacos biocerámicas: Avances y perspectivas*. (Instituto de España- Real Academia Nacional de Farmacia, 2006).
7. Nieto Peña, A. Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón. (Universidad Complutense de Madrid, 2011).
8. Esquivel Merino, M. D. Síntesis, Caracterización y Aplicaciones de Materiales Periódicos Mesoporosos Organosilícicos. (Universidad de Córdoba, 2011).
9. De Oliveira Freitas, L. B., Gonzalez Bravo, I. J., De Almeida Macedo, W. A. & Barros de Sousa, E. M. Mesoporous silica materials functionalized with folic acid: preparation, characterization and release profile study with methotrexate. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (2015). doi:10.1007/s10971-015-3844-8
10. Arriagada, F. *et al.* Morin Flavonoid Adsorbed on Mesoporous Silica, a Novel Antioxidant Nanomaterial. *PLoS ONE* 11, 1-22 (2016).
11. Vallet-regí, M., Balas, F. & Arcos, D. Mesoporous Material for Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 7548-7558 (2007).
12. Martino, C., Merino, M. G., Lascalea, G. & Romanelli, G. Síntesis de nanosilices funcionalizadas para su aplicación como fillers en adhesivos.

(2008).

13. López Goerne, T. M. en *Nanotecnología y nanomedicina: la ciencia del futuro... hoy* 59-80 (Arkhé, 2011).
14. Todorova, E., Chernev, G., Djambazov, S. & Tsvetkova, Y. Sol - gel silica hybrid materials applicable for external treatment of concrete defects. *Journal of Chemical Technology and Metall* 50, 459-467 (2015).
15. Katzung, B. G., Masters, S. B. & Trevor, A. J. *Farmacología Básica y Clínica*. (Mc Graw Hill, 2012).
16. Goodman & Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. (Mc Graw-Hil Interamericanal, 2012).
17. Mabrouk, M., Mostafa, A., Oudadesse, H., Mahmoud, A. & El-gohary, M. Effect of ciprofloxacin incorporation in PVA and PVA bioactive glass composite scaffolds. *Ceramics International* 40, 4833-4845 (2014).
18. PLM. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. (2016).
19. *Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 11 ed. México; (2013).*
20. NOM-177-2013 NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad.
21. Vallet Regí, M., Colilla, M. & González, B. Medical applications of organic-inorganic hybrid materials within the field of silica-based bioceramics. *Chemical Society reviews* 40, 596-607 (2011).
22. Catauro, M., Raucci, M., Convertito, C., Melisi, D. & Rimoli, M. Characterization, bioactivity and ampicillin release kinetics of TiO₂ and TiO₂SiO₂ synthesized by sol-gel processing. *Journal of Materials Science: Materials in medicine* 17, 413-420 (2006).
23. Czarnobaj, K. & Łukasiak, J. In vitro release of cisplatin from sol-gel processed organically modified silica xerogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18, 2041-2044 (2007).
24. Hernández, A., Esquivel Ferriño, P., Gomez, I. & Cantú, L. Effect of the Sol-Gel Synthesis Parameters on the Incorporation of an Anti-inflammatory Drug in a Ceramic Material. *Materials Research Society MRS Spring Meeting* 2-7 (2007).
25. López, T. *et al.* Kinetic study of controlled release of VPA and DPH antiepileptic drugs using biocompatible nanostructured sol-gel TiO₂. *Journal of Materials Science* 44, 5459-5468 (2009).
26. González Hurtado, M., Rieumont Briones, J., López Goerne, T. & Castro

- González, L. M. Síntesis y caracterización de materiales nanoestructurados obtenidos por el método sol-gel , cargados con drogas antiepilépticas. *Revista Cubana de Química XXVI*, 202-215 (2014).
27. Sundblom, A., Oliveira, C. L., Pedersen, J. S. & Palmqvist, A. E. On the formation mechanism of pluronic-templated mesostructured silica. *Journal of Physical Chemistry C* 114, 3483-3492 (2010).
 28. Bhattacharyya, S., Agrawal, A., Knabe, C. & Ducheyne, P. Sol-gel silica controlled release thin films for the inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* 35, 509-517 (2014).
 29. Hu, L. *et al.* Alginate encapsulated mesoporous silica nanospheres as a sustained drug delivery system for the poorly water-soluble drug indomethacin. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9, 183-190 (2014).
 30. Kawashita, M. *et al.* In vitro apatite formation and drug loading/release of porous TiO₂ microspheres prepared by sol-gel processing with different SiO₂ nanoparticle contents. *Materials Science and Engineering: C* 50, 317-323 (2015).
 31. Mohseni, M., Gilani, K. & Alireza, S. Preparation and Characterization of Rifampin Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles as a Potential System for Pulmonary Drug Delivery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 14, 27-34 (2015).
 32. Sasikumar, S. Effect of particle size of calcium phosphate based bioceramic drug delivery carrier on the release kinetics of ciprofloxacin hydrochloride: an in vitro study. *Frontiers of Materials Science* 7, 261-268 (2013).
 33. Sureshkumar, V., Sarathchandra, G. & Ramesh, J. Veterinary pharmacovigilance evaluation on impact of enrofloxacin administration on antioxidant status in broiler chicken. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2, 335-341 (2013).
 34. Cicco, S. R. *et al.* Chemically Modified Diatoms Biosilica for Bone Cell Growth with Combined Drug-Delivery and Antioxidant Properties. *ChemPlusChem* 80, 1104-112 (2015).
 35. El-Gamel, N. E. A., Hawash, M. F. & Fahmey, M. A. Structure characterization and spectroscopic investigation of ciprofloxacin drug. *Journal of Thermal Analysis & Calorimetry* 108, 253-262 (2012).
 36. Cicuéndez, M., Izquierdo Barba, I., Portolés, M. T. & Vallet-Regí, M. Biocompatibility and levofloxacin delivery of mesoporous materials. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84, 115-124 (2013).
 37. Ramirez Montaña, T. O. Evaluación de las características de liberación de isoniazida a partir de un biomaterial cerámico. (2015).

38. López Goerne, T. M. *et al.* Obtaining of Sol-Gel Ketorolac-Silica Nanoparticles: Characterization and Drug Release Kinetics. *Journal of Nanomaterials* (2013).
39. Ojeda López, R., Pérez Hermosillo, I. J., Esparza Schulz, J. M. & Domínguez Ortiz, A. Efecto de la temperatura de calcinación sobre la concentración de grupos silanoles en superficies de SiO₂ (SBA-15). *Avances en Química* 9, 21-28 (2014).
40. López, T., Basaldella, E. I., Ojeda, M. ., Manjarrez, J. & Alexander Katz, R. Encapsulation of valproic acid and sodic phenytoin in ordered mesoporous SiO₂ solids for the treatment of temporal lobe epilepsy. *Optical Material* 29, 75-81 (2006).
41. John, F. & George, J. Curcumin Encapsulated Alginate / Pluronic Block Copolymer Micelles as a Promising Therapeutic Agent. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences* 2, 6-12 (2014).
42. Sahoo, S., Chakraborti, C., Naik, S., Mishra, S. & Nanda, U. Structural Analysis of Ciprofloxacin-Carbopol Polymeric Composites by X-Ray Diffraction and Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10, 273-280 (2011).
43. Martín Martínez, J. M. *Adsorción física de gases y vapores por carbones*. (Universidad de Alcanté, 1990).
44. Malvern Instruments Worldwide. *INFORM WHITE PAPER DYNAMIC LIGHT SCATTERING*. (2011).
45. Shaw, R. Dynamic Light Scattering Training Achieving reliable nano particle sizing. (2013).
46. Branco de Barros, A. L. *et al.* Synthesis, characterization, and biodistribution studies of ^{99m}Tc-labeled SBA-16 mesoporous silica nanoparticles. *Materials Science and Engineering C* 56, 181-188 (2015).
47. Gu, C. & Karthikeyan, K. G. Sorption of the Antimicrobial Ciprofloxacin To Aluminum and Iron Hydrous Oxides. *Environmental Science & Technology* 39, 9166-9173 (2005).